

MARCOS ANTONIO DE OLIVEIRA

RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Química,
Curso de Pós-Graduação em Química – Área
de Concentração em Química Orgânica, Setor
de Ciências Exatas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Marques
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Nadia Krieger

CURITIBA

2007

A DEUS

Por me dar força e coragem nos momentos difíceis
e por permitir que eu chegasse ate aqui

Aos meus pais José e Maria e
demais familiares.

Aos meus queridos amigos de valores
inestimáveis, famílias Küster e Weber

AGRADECIMENTOS

Ao professor Francisco de Assis Marques pela orientação, oportunidade e paciência durante todo o trabalho.

A professora Nadia Krieger pela co-orientação e disposição do seu laboratório

Professoras Gisella Maria Zanin-UEM e Beatriz Helena Lameiro Noronha Sales Maia pela participação, contribuição, observação e correção do meu Exame de Defesa.

Ao professor Brás pelas importantes observações no Exame de Qualificação.

Ao professor Andersson Barison pelos préstimos nos aparelhos e elucidação dos espectros de RMN.

A professora Maria Aparecida e seu esposo Ângelo pela ajuda, carinho e incentivo.

As técnicas Selma e Paula por suas disposições e ajuda que me deram.

A aluna e amiga Mayara pela dedicação e ajuda durante o trabalho.

Aos “eterno amigos” do LEQSO.

Aos amigos do LECOSIN

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise.

Aos professores do departamento que participaram durante toda minha formação acadêmica, intelectual e profissional.

A todos os discentes do programa de Pós-Graduação.

Aos funcionários do departamento (técnicos e técnicos administrativos).

Aos queridos amigos Eloy, Célia e Flavinha (tiquinha) que a cada dia presenteam-me com suas agradáveis companhias.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
I. INTRODUÇÃO	2
I.1 – Lipases	3
I. 2 - Fontes de obtenção	5
I. 3 - Atividade enzimática	6
I. 4 - Emprego de lipases em síntese orgânica	8
I. 5 - Mecanismo de reação de transesterificação enzimática de álcoois	10
I. 6 - Efeito do solvente na enantiosseletividade de lipases	12
I. 7 - Variação conformacional induzida por solventes	13
I. 8 - Hidrofobicidade do solvente	14
I. 9 - A enzima Novozyme 435	15
I. 10 - A enzima Lipozyme TL	16
I. 11 - A enzima Lipozyme RM	16
I. 12 - A enzima de <i>Burkholderia cepacia</i>	17
I. 13 - Álcoois secundários quirais em síntese orgânica	17
I.14 - Álcoois secundários e enantiosseletividade da enzima	18
II. OBJETIVOS	21
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
III. 1 - Resolução enzimática de álcoois acetilênicos	23
III. 2 - Resolução via hidrólise enzimática	25
III. 3 - Preparação dos álcoois alílicos terminais	31

SUMÁRIO

III. 4 - Resolução enzimática dos álcoois alílicos	32
IV. CONCLUSÕES	39
V. PERSPECTIVAS FUTURAS	41
VI. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	43
VI. 1 - Aspectos Gerais	43
VI. 2 - Preparação do 5-metil-1-hexin-3-ol (1)	45
VI. 3 - Resolução enzimática do 5-metil-1-hexin-3-ol (1) com <i>Candida antarctica</i>	45
VI. 4 - Resolução enzimática do 5-metil-1-hexin-3-ol (1) com <i>Burkholderia cepacia</i>	46
VI. 5 - Resolução enzimática do 5-metil-1-hexin-3-ol (1) com <i>Thermomyces lanuginosus</i>	46
VI. 6 - Resolução enzimática do 5-metil-1-hexin-3-ol (1) com <i>Rhizomucor miehei</i>	46
VI.7 - Procedimento geral de acetilação química dos álcoois secundários	47
VI.8 - Preparação do 5-metilhex-1-en-3-ol (5)	47
VI. 9 - Preparação do 1-octen-3-ol (6)	48
VI. 10 - Preparação do 1-nonen-3-ol (7)	49
VI. 11 - Preparação do (<i>m</i> -metoxifenil)prop-2-en-1-ol (8)	50
VI. 12 - Preparação do (<i>p</i> -metoxifenil)prop-2-en-1-ol (9)	51
VI. 13 - Preparação do 1-fenilprop-2-en-1-ol (10)	52
VI. 14 - Preparação do <i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol (11)	53
VI.15 - Acetilação enzimática do 5-metilhex-1-en-3-ol (5) com <i>Candida antarctica</i>	54
VI.16 - Acetilação enzimática do 1-octen-3-ol (6) com <i>Candida antarctica</i>	54
VI.17 - Acetilação enzimática do 1-nonen-3-ol (7) com <i>Candida antarctica</i>	55
VI.18 - Acetilação enzimática do (<i>m</i> -metoxifenil)prop-2-en-1-ol (8) com <i>Candida antarctica</i>	56
VI. 19 - Acetilação enzimática do 1-fenilprop-2-en-1-ol (10) com <i>Candida antarctica</i>	56
VI. 20 - Acetilação enzimática do <i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol (11) com <i>Candida antarctica</i>	57
VI. 21 - Preparação das amostras para Polarimetria	58

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
VIII – ESPECTROS SELECIONADOS	75
VIII. 1 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (S)-(-)-1-fenilprop-2-en-1-ol(10).	75
VIII. 2 – Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do (S)-(-)-1-fenilprop-2-en-1-ol(10).	76
VIII. 3 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do acetato de (R)-(+)-1-fenilprop-2-enila(17).	77
VIII. 4 – Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do acetato de (R)-(+)-1-fenilprop-2-enila(17).	78
VIII. 5 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (S)-(-)-(m-metoxifenil)prop-2-en-1-ol(8).	79
VIII. 6 – Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do (S)-(-)-(m-metoxifenil)prop-2-en-1-ol(8).	80
VIII. 7 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do acetato de (R)-(+)-(m-metoxifenil)prop-2-enila(15).	81
VIII. 8 – Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do acetato de (R)-(+)-(m-metoxifenil)prop-2-enila(15).	82
VIII. 9 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (S)-(-)-p-clorofenilprop-2-en-1-ol(11).	83
VIII. 10 – Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do (S)-(-)-p-clorofenilprop-2-en-1-ol(11).	84
VIII. 11 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (S)-(-)-(p-metoxifenil)prop-2-en-1-ol(9).	85
VIII. 12 – Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do (S)-(-)-(p-metoxifenil)prop-2-en-1-ol(9).	86
VIII. 13 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do acetato de (R)-(+)-1-(p-clorofenil)prop-2-enila(18)	87
VIII. 14 – Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do acetato de (R)-(+)-1-(p-clorofenil)prop-2-enila(18)	88
VIII. 15 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (R)-(+)-1-octen-3-ol(6).	89

SUMÁRIO

VIII. 16 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do acetato de (S)-(-)-1-pentilprop-2-enila(13).	90
VIII. 17 – Espectro de MS (IE) do (R)-(+)-1-octen-3-ol (6).	91
VIII. 18 – Espectro de MS (IE) do (S)-(-)- (<i>m</i> -metoxifenil)prop-2-en-1-ol (8).	92
VIII. 19 – Espectro de MS (IE) do (S)-(-)-1-fenilprop-2-en-1-ol (10).	93
VIII. 20 – Espectro de massas (IE) do (S)-(-)- <i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol (11).	94
VIII. 21 – Espectro de MS (IE) do acetato de (S)-(-)- 1-pentilprop-2-enila (13).	95
VIII. 22 – Espectro de MS (IE) acetato de (R)-(+)-1-(<i>m</i> -metoxifenil) prop-2-enila (15).	96
VIII. 23 – Espectro de MS (IE) do acetato de (R)-(+)-1-fenilprop-2-enila (17).	97
VIII. 24 – Espectro de MS (IE) do acetato de (R)-(+)- <i>p</i> -clorofenilprop-2-enila (18).	98
VIII. 25 – Espectro de FTIR do (R)-(+)-1-octen-3-ol (6).	99
VIII. 26 – Espectro de FTIR do acetato de (S)-(-)-1-pentilprop-2-enila (13).	100
VIII. 27 – Espectro de FTIR do (S)-(-)-1-fenilprop-2-en-1-ol (10).	101
VIII. 28 – Espectro de FTIR do acetato de (R)-(+)-1-fenilprop-2-enila (17).	102
VIII. 29 – Espectro de FTIR do (S)-(-)- (<i>m</i> -metoxifenil)prop-2-en-1-ol (8).	103
VIII. 30 – Espectro de FTIR acetato de (R)-(+)-1-(<i>m</i> -metoxifenil) prop-2-enila (15).	104
VIII. 31 – Espectro de FTIR do (S)-(-)- <i>p</i> -clorofenilprop-2-en-1-ol (11).	105

LISTA DE ABREVIATURAS

Abund.	– abundância
CCD	- cromatografia em camada delgada
CG	- cromatografia gasosa
E.M	- espectro de massa
IE	- impacto de elétrons
IR	- infra vermelho
J	- constante de acoplamento
<i>m/z</i>	- relação massa carga
RMN- ¹³C	- ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹H	- ressonância magnética nuclear de hidrogênio
tr	- tempo de retenção

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol.	3
Figura 2. Reação de hidrólise do palmitato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> -NPP).	7
Figura 3. Alternativas biossintéticas que podem ser empregadas na resolução enantiomérica de um álcool racêmico através de hidrolases.	9
Figura 4. Representação esquemática do mecanismo de uma reação de transesterificação entre um álcool e um éster vinílico catalisada por uma lipase de <i>Humicola lanuginosa</i> . (Baseado em Holmquist <i>et al.</i> , 1995).	11
Figura 5. Representação esquemática para os modos de ligação dos enantiômeros <i>R</i> e <i>S</i> do álcool sec-feniletanol e o sítio ativo da enzima acilada.	14
Figura 6. Representação esquemática dos modos de ligação dos enantiômeros <i>R</i> e <i>S</i> ao sítio ativo de <i>Aspergillus oryzae</i> (Tawaki e Klibanov, 1992).	15
Figura 7. Enantiômero que reagiu mais rapidamente com a enzima <i>Culvaria lunata</i> e <i>Rhizopus nigrigans</i> , conforme testes realizado por Prelog (Prelog, 1964).	17
Figura 8. Síntese do álcool 5-metil-1-hexin-3-ol com acetileto de lítio comercial.	26
Figura 9. Resolução enzimática via acetilação com <i>Candida antarctica</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Thermomyces lanuginosus</i> , <i>Rhizomucor miehei</i> .	27
Figura 10. Preparação do acetato de 2-pentila a partir do 2-pentanol .	29
Figura 11. Resolução de hidrólise enzimática na presença da enzima de <i>Thermomyces lanuginosus</i> e <i>Candida antarctica</i> .	29
Figura 12. Resolução via hidrólise enzimática na presença da enzima de <i>Thermomyces lanuginosus</i> .	30
Figura 13. Resolução via hidrólise enzimática na presença da enzima <i>Cândida antarctica</i> .	31

- Figura 14.** Resolução de hidrólise enzimática do acetato de 1-isobutilprop-2-ino (2) na presença da enzima de *Candida antarctica*. 33
- Figura 15.** Preparo dos álcoois alílicos terminais com cloreto de vinil magnésio comercial. 34
- Figura 16.** Preparação dos álcoois alílicos terminais com cloreto de vinil magnésio comercial em éter à baixa temperatura. 34
- Figura 17.** Resolução enzimática via acetilação com CALB. 36
- Figura 18.** Resolução enzimática do 5-metilhex-1-en-3-ol (5) com *Candida antarctica*. 37
- Figura 19.** Resolução enzimática do 1-fenilprop-2-en-1-ol (10) com *Candida antarctica*. 38
- Figura 20.** Aplicação dos álcoois alílicos resolvidos na síntese de feromônios. 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lipases microbianas disponíveis comercialmente.	3
Tabela 2. Aplicações das lipases	7
Tabela 3. Atividades das lipases de <i>Candida antarctica</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Thermomyces lanuginosus</i> , <i>Rhizomucor miehei</i> , em meio aquoso.	27
Tabela 4. Resultados da resolução enzimática via acetilação com acetato de vinila.	28
Tabela 5. Álcoois alílicos terminais preparados conforme figuras 15 e 16	40
.	
Tabela 6. Resultados da resolução enzimática dos álcoois alílicos via acetilação com acetato de vinila na presença de CAL-B.	41

RESUMO

Neste trabalho foi testada a capacidade de resolução de três lipases diferentes em álcoois secundários. As lipases estudadas foram de, *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM, Novozymes) *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM, Novozymes) e *Burkholderia cepacia*, sendo as duas primeiras comerciais e a última produzida no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise do Departamento de Química da UFPR. Este estudo foi realizado empregando-se a enzima de *Candida antarctica* (Lipozyme CAL-B IM, Novozymes), como referência. A enzima que obteve menor desempenho em termos de velocidade de reação e enantiosseletividade foi a de *Rhizomucor miehei* e a de maior desempenho nos mesmos parâmetros foi a de *Candida antarctica*.

Outro estudo realizado neste trabalho foi a resolução de álcoois secundários envolvendo a esterificação química da mistura racêmica dos álcoois com posterior hidrólise enzimática utilizando-se as enzimas de *Thermomyces lanuginosus* e *Candida antarctica*. Os melhores resultados foram obtidos com a enzima de *Candida antarctica*.

Devido a dificuldades na obtenção de tais enzimas, resolveu-se estudar a resolução de álcoois alílicos terminais com *Candida antarctica*. Os testes de resolução enzimática apresentaram boa estereosseletividade, porém ressaltou-se uma melhor eficiência em termos de velocidade de reação e enantiosseletividade para as moléculas aromáticas. Tais resultados abrem perspectivas para um trabalho envolvendo a síntese de β -iodo epóxidos quirais, importantes intermediários de reações na síntese de feromônios de lepidópteros.

ABSTRACT

In this work the capacity of resolution of three lipase different in secondary alcohols was tested. Lipase studied were of, *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM, Novozymes) *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM, Novozymes) and *Burkholderia cepacia*, being the two first ones commercial and the last one produced in the Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise - Department of Chemistry - UFPR. This study was carried through using the enzyme of *Candida antarctica* (Lipozyme CAL-B IM, Novozymes), as reference. The enzyme that lead to the poorest performance in terms of rate reaction and enantioselectivity was the one of *Rhizomucor miehei* and the one of the best performance in the same parameters was the *Candida antarctica*.

Another study carried through in this work was the resolution of secondary alcohols involving the chemical sterification of the racemic mixture of the alcohols with posterior enzymatic hydrolysis using enzymes of *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica*. The best results were obtained with the enzyme of *Candida antarctica*.

Due to the difficulties in the attainment of such enzymes, it was decided to study the resolution of terminal allyl alcohols with *Candida antarctica*. The tests of enzymatic resolution presented good stereoselectivity, however a better efficiency in terms of rate reaction and enantioselectivity for aromatic molecules stand out. Such results open out perspectives for a work involving the synthesis chirals β -iodo epoxides, an important intermediate in the synthesis of lepidoptera pheromones.

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas isoladas na transformação de compostos orgânicos é conhecida há mais de cem anos, apesar deste potencial ter sido mais intensamente explorado a partir da segunda metade da última década. Durante este período um grande número de reações catalisadas por enzimas foram desenvolvidas e tornaram-se familiares aos químicos orgânicos. Dentre as principais enzimas utilizadas destacam-se as lipases por apresentarem capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. Não obstante, o elevado potencial de aplicação das lipases também é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente a temperatura, pH e solventes orgânicos, e sua quimio-régio e enantiosseletividade. Uma das principais contribuições deste tipo de metodologia biossintética tem sido na obtenção de compostos enantioméricamente puros ou enriquecidos, geralmente intermediários ou produtos finais de rotas sintéticas estereocontroladas (Sih e Wu, 1989; Santaniello *et al.*, 1990; Theil, 1995; Stecher e Faber, 1997).

A tecnologia enzimática é hoje uma das áreas mais promissoras entre as novas tecnologias para a síntese de compostos com alto valor agregado. Nos países desenvolvidos, os projetos nesta área são considerados prioritários e executados por grupos de pesquisa com alto potencial de produção de conhecimento e geração de tecnologias de ponta. No Brasil, por outro lado, a tecnologia de produção e de aplicação de enzimas em nível industrial está em poder de algumas companhias internacionais, que não desenvolvem pesquisas no país, limitando a participação do Brasil como consumidor de tais produtos. A enzima de *Burkholderia cepacia* produzida no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise do Departamento de Química da UFPR, abre uma perspectiva na mudança desse quadro, pois se trata de uma enzima cujo as variáveis do sistema estão sendo estudadas, o que justifica o trabalho, pois os testes de capacidade de resolução desta enzima podem apontar para novas alternativas biosintéticas envolvendo compostos racêmicos.

I.1 - Lipases

As enzimas são classificadas e codificadas pela NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) de acordo com a reação catalisada. A nomenclatura utiliza a abreviação E.C. (Enzyme Commission) seguida de até 4 dígitos referentes à classe e subclasses a que pertence a enzima.

Entre as enzimas mais empregadas tanto em nível industrial (indústria alimentícia, de cosméticos e perfumes, biomédica, pesticidas, detergentes, entre outras) como acadêmico, encontram-se as lipases (Pandey *et al.*, 1999). Lipase é o nome genérico para um grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases (E.C.3.1.1.3), são enzimas hidrolíticas que “in vivo” catalisam a hidrólise de triglicerídeos aos ácidos graxos correspondentes e glicerol (Figura 1), na interface água e óleo (Ul-Haq *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2001; Cajal *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2000; Del Rio *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2000; Costa e Amorim, 1999; Russel *et al.*, 1998; Selmi *et al.*, 1998; Jesus *et al.*, 1997; Macedo e Pastore, 1997). São capazes de catalisar não apenas reações de hidrólise mas também atuam na alcoólise e aminólise, e “in vitro”, as lipases podem atuar também como catalisadores em reações de esterificação ou transesterificação, quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese (Krishna *et al.*, 2000; Leblanc *et al.*, 1998; Nagayama *et al.*, 1998; Russel *et al.*, 1998; Selmi *et al.*, 1998; Macedo e Pastore, 1997) (Figura 1).

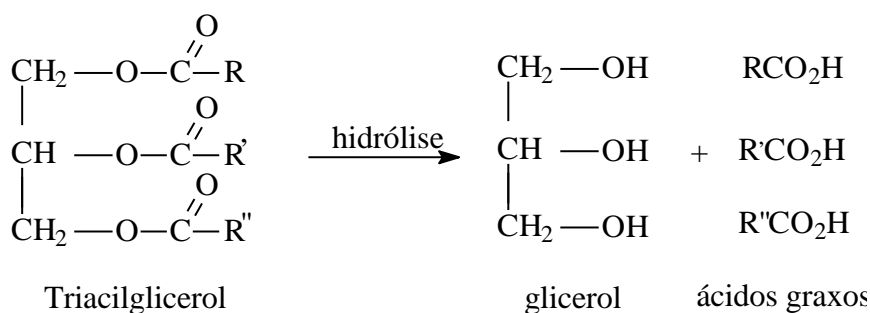


Figura 1. Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol.

As esterases (E.C. 3.1.1.1) (Egloff *et al.*, 1995) que muitas vezes são difíceis de diferenciar das lipases, são carboxil éster hidrolases amplamente distribuídas na natureza, pois atuam essencialmente catalisando a hidrólise de ésteres. Porém, sua

atividade enzimática está restrita à hidrólise de ligações éster em substratos solúveis em água (Bornscheuer, 2002; Bornscheuer e Kazlauskas, 1999; Phytian, 1998). Ambas as enzimas são produzidas por praticamente todos os organismos vivos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias (Bornscheuer, 2002; Villeneuve *et al.*, 2000; Essamri *et al.*, 1998).

O problema da diferenciação entre lipases (E.C.3.1.1.3) e esterases (E.C.3.1.1.1) foi estudado por vários autores e ainda existem controvérsias. Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética: a propriedade de ativação na presença de substratos pouco solúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água. A determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Rhizomucor michei* (Brady *et al.*, 1990), *Geotrichum candidum* (Schrag *et al.*, 1991) e da lipase pancreática humana (Winkler *et al.*, 1990), propiciou uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial: o sítio ativo destas enzimas apresentava recoberto por uma “tampa” hidrofóbica ou *lid*, que ao interagir com a interface lipídeo/água sofreria uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases.

Entretanto, mais recentemente foi observado que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, tendo sido descritas lipases, como a de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antartica B* que apresentam a *lid* em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (Jaeger e Reetz, 1998). As lipases tem sido definidas recentemente como, enzimas que hidrolisam triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de dez átomos de carbono, enquanto que as esterases são enzimas que hidrolisam acilgliceróis compostos de ácidos graxos de cadeia curta, menos de dez átomos de carbono (Bornscheuer, 2002; Nini *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2001; Jaeger *et al.*, 1999; Ferrato *et al.*, 1997; Verger, 1997; Egloff *et al.*, 1995). Deve-se enfatizar, entretanto que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos das esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (Jaeger *et al.*, 1999).

I. 2 - Fontes de obtenção

Entre as lipases de vegetais, animais e microbianas, estas últimas são as mais utilizadas por sua facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las. As fontes fúngicas têm sido preferencialmente utilizadas, não devido as suas melhores características em relação às lipases bacterianas, mas sim porque na sua grande maioria não são nocivas à saúde humana (Jaeger *et al.*, 1994).

Fungos de diversos gêneros demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial, como lipases de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium roqueforti* e da levedura *Candida rugosa* que estão sendo comercializadas pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltda., UK) para processamento de óleos, gorduras e queijos, para a determinação de triglicerídeos, como aditivo em preparações digestivas e para síntese quiral.

Dentre as bactérias produtoras de lipases estão disponíveis comercialmente as enzimas de *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas fluorescens* e *Burkholderia cepacia*, que vêm sendo empregadas na síntese de compostos quirais e as lipases *Burkholderia sp.* e *Arthrobacter sp.*, utilizadas na determinação diagnóstica de triacilgliceróis (Tabela 1). O rápido crescimento celular, em relação aos fungos, se constitui em uma das vantagens das fontes bacterianas como produtoras destas enzimas (Jaeger *et al.*, 1999).

Tabela 1. Lipases microbianas disponíveis comercialmente.

Tipo	Fonte	Aplicação	Fabricante
Fungos	<i>Candida rugosa</i>	Síntese orgânica	Amano, Biocatalyst, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>Candida antarctica</i>	Síntese orgânica	Boehringer Mannheim, Novozymes
	<i>T. lanuginosus</i>	Aditivos em detergentes	Boehringer Mannheim, Novozymes
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Alimentos	Biocatalyst, Amano, Novozymes
Bactérias	<i>Burkholderia cepacia</i>	Síntese orgânica	Boehringer Mannheim, Amano, Genencor
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Aditivos em detergentes	Genencor
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Aditivos em detergentes	Genencor
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Síntese orgânica	Biocatalyst, Asahi

Fonte: Jaeger e Reetz, 1998

I. 3 – Atividade enzimática

Determinar a atividade enzimática de uma lipase é uma tarefa árdua, pois a enzima atua em substratos não solúveis em água e sua atividade está mais relacionada com a área interfacial da emulsão do que com a concentração do substrato. Os métodos em geral baseiam-se na quantificação dos ácidos graxos liberados por hidrólise enzimática de um triacilglicerol ou de um substrato artificial.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para acompanhar a atividade lipolítica em reação de hidrólise, sendo os mais citados o titulométrico, usando triacilglicerois, principalmente trioleína, como substrato e os espectrofotométricos, que utilizam substratos sintéticos. A trioleína é o substrato natural e ideal para lipases, porque é líquida nas temperaturas requeridas nos ensaios, facilitando a emulsificação. O óleo de oliva é um substrato que pode substituir a trioleína, pois é mais barato (Jensen, 1983).

O método titulométrico, embora seja pouco sensível, é o método oficial para a determinação da atividade lipolítica. Baseia-se na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima com um volume de NaOH ou KOH. O volume de base utilizada, em função do tempo de reação, está relacionado com a quantidade de ácidos graxos liberada e conseqüentemente com a atividade enzimática. Neste método, são utilizados como substratos o óleo de oliva, a trioleína e tributirina, em meio emulsionado (Krieger, 1995; Stuer *et al.*, 1986).

Os ácidos graxos liberados durante a incubação da enzima em uma emulsão de trioleína também podem ser quantificados pelo método de Lowry-Tinsley, que é o método colorimétrico no qual os ácidos graxos são extraídos do meio emulsionado com solvente orgânico e complexados com Ânions (II). A formação do complexo origina uma coloração azul seletiva, que pode ser medida a 715nm. Inúmeros trabalhos utilizam este método (Krieger, 1997; Carvalho *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 1999; Carneiro da Cunha *et al.*, 1994; Cabral *et al.*, 1993;). Em meio aquoso e em meio de solvente orgânico. Este método também pode ser utilizado para avaliar a capacidade de síntese da lipase, e neste caso determina-se o desaparecimento do ácido graxo do meio reacional, pela formação do éster.

Os métodos espectrofotométricos baseiam-se na hidrólise de substratos sintéticos, principalmente ésteres de *p*-nitrofenila, com cadeias de ácidos graxos variando de 12 a 18 carbonos. A atividade enzimática é determinada a 410 nm, pelo desenvolvimento de coloração amarela devido à liberação do *p*-nitrofenol (Krieger *et al.*, 1999; Krieger *et al.*, 1995; Pimentel *et al.*, 1994; Stuer *et al.*, 1986). (Figura 2).

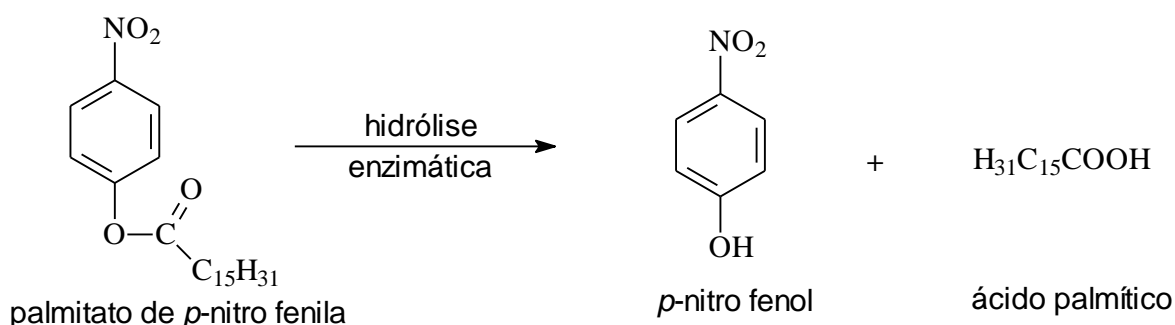


Figura 2 . Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (pNPP)

Com relação às unidades de atividade, esta é expressa em U/mL ou U/mg, que significa micromol de substrato consumido por mililitro da solução enzimática ou por miligramas da enzima, que pode ser calculada segundo a fórmula:

$$A = \frac{B \times 60 \times n}{0,978} = \text{U/ mL}$$

onde:

A = Atividade volumétrica da enzima

B = coeficiente angular da curva correspondente ao gráfico da cinética de reação

n = fator de diluição da enzima

I. 4 - Emprego de lipases em síntese orgânica

As lipases estão entre os biocatalisadores mais empregados em síntese orgânica (Gotor, 1999; Theil 1995; Itoh *et al.*,1997; Schmid e Verger, 1998). Uma das razões está relacionada com a sua relevância medicinal, principalmente em doenças como a arteriosclerose e hiperlipidímia e sua importância na regulação e metabolismo. Os produtos da lipólise como ácidos graxos livres e diacilgliceróis desempenham muitos papéis importantes, especialmente como mediadores na ativação celular e na transdução de sinais (Villeneuve *et al.*, 2000), outra razão mais importante do ponto de vista de desenvolvimento de aplicações, está relacionada com a diversidade de sua função catalítica. As lipases possuem a capacidade de atuar sobre substratos insolúveis em água, como os óleos e gorduras, cujas propriedades físicas e valores comerciais dependem da estrutura do glicerol, bem como, do tipo de ácido graxo esterificado. Dependendo da polaridade e da solubilidade, o substrato poderá ser dissolvido na fase aquosa ou na que contém o óleo (Balcão,1998). As lipases são ferramentas poderosas não apenas nas reações de hidrólise, mas também em reações como esterificação, transesterificação, interesterificação em solventes orgânicos (Chowdary *et al.*, 2001; Hamsaveni *et al.*, 2001; Kiran *et al.*, 2001; Kiyota *et al.*, 2001; Krishna *et al.*, 2001; Rao e Divakar, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Krishna *et al.*, 2000; Villeneuve *et al.*, 2000; Russel *et al.*, 1998; Selmi *et al.*, 1998), (Figura 3).

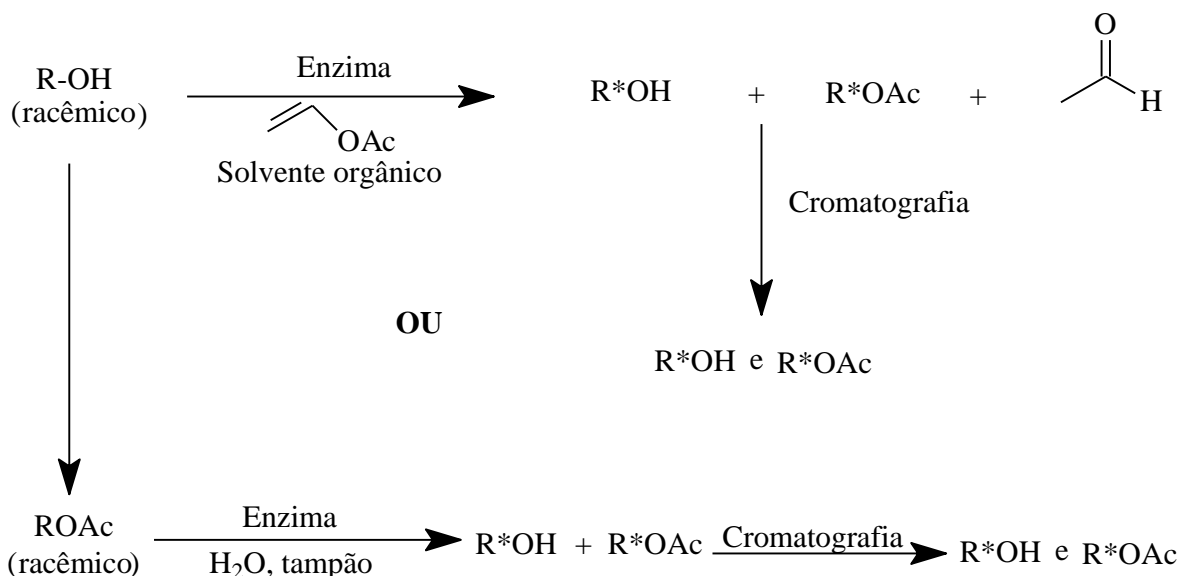


Figura 3. alternativas biossintéticas que podem ser empregadas na resolução enantiomérica de um álcool racêmico por meio de hidrolases

Tanto na reação de hidrólise ou na esterificação biossintética, a resolução enantiomérica é realizada na etapa biocatalítica. Dependendo da enzima, substrato e condições experimentais utilizadas, podem ser obtidos diferentes enantiômeros de ROH^* e $ROAc^*$.

Dada a versatilidade das lipases e a alta enantiosseletividade apresentada em resoluções de tais classes de compostos orgânicos, tem crescido substancialmente seu emprego na síntese de produtos naturais e de compostos biologicamente ativos. Vários artigos de revisão foram publicados mais recentemente dando ênfase ao emprego de lipases na síntese de produtos naturais quirais (Roberts, 1998; Roberts, 1999; Roberts, 2000; Davis e Boyler, 2001), (Tabela 2).

Tabela 2. Aplicações das lipases.

Tipos de reações	Areas de Aplicação	Produtos	Referências
Hidrólise			
	Alimentos	Agentes flavorizantes para queijos e derivados	Jaeger e Reetz, 1998; Patel <i>et al.</i> , 1996; Chen e Chang, 1993
	Química Óleos	Ácidos graxos, diglicerídeos monoglicerídeos	Undurraga <i>et al.</i> , 2001; Villeneuve <i>et al.</i> , 2000; Carvalho <i>et al.</i> , 2000
	Química Detergente	Detergentes para lavanderias e uso doméstico	Liese <i>et al.</i> , 2000; Villeneuve <i>et al.</i> , 2000; Pandey <i>et al.</i> , 1999
Esterificação			
	Química Fina	Intermediários quirais ésteres emulsificantes	Liese <i>et al.</i> , 2000; Villeneuve <i>et al.</i> , 2000
	Química Alimentos	Óleos ou gorduras, flavorizantes e aromatizantes	Osório <i>et al.</i> , 2001 Undurraga <i>et al.</i> , 2001; Villeneuve <i>et al.</i> , 2000
	Química farmacêutica	Drogas antiinflamatórias como anproxeno, ibuprofeno, suprofen	Van Dyck <i>et al.</i> , 2001; Xin <i>et al.</i> , 2000; Pandey <i>et al.</i> , 1999

I. 5 - Mecanismo de reação de transesterificação enzimática de álcoois

No Figura 4. abaixo é mostrado o mecanismo geral para a reação de transesterificação de um álcool catalisada por uma lipase de *Humicola lanuginosa*.

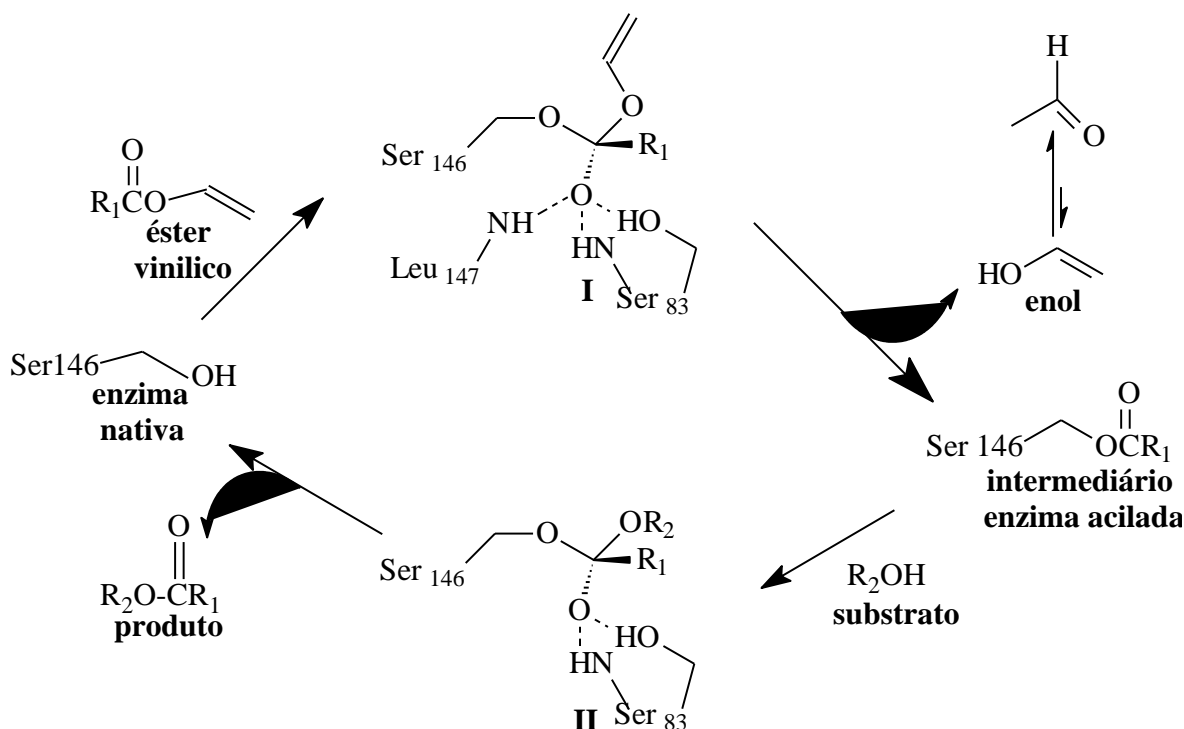


Figura 4. representação esquemática do mecanismo de uma reação de transesterificação entre um álcool e um éster vinílico catalisada por uma lipase de *Humicola lanuginosa*. (Baseado em Holmquist *et al.*, 1995).

Na representação esquemática mostrada na Figura 4 que existem dois estados de transição diferentes envolvidos no rearranjo de ligações que ocorre durante o processo catalítico. O primeiro estado de transição (I) gerado durante a transformação do complexo de Michaelis-Menten entre a enzima e o doador acila (éster vinílico) em uma espécie intermediária denominada enzima acilada. Normalmente, são empregados ésteres vinílicos como doadores acila. Nestes casos, o enol formado após acilação do resíduo reativo da tríade catalítica é rapidamente transformado em seu tautômero (acetaldeído), que é mais estável e volátil. Esta estratégia desloca o equilíbrio da reação na direção dos produtos por impedir uma possível competição nucleofílica entre o álcool formado nesta etapa e o substrato.

Reações de transesterificação realizadas com excesso de doador acila (éster vinílico) e em solventes orgânicos anidros são irreversíveis. O segundo estado de transição (II) mostrado na Figura 4, ocorre quando a espécie intermediária enzima-acilada é clivada pelo álcool R_2OH , formando um éster como produto. Nos estados de transição (I) e (II), a carga negativa gerada sobre o oxigênio após o ataque nucleofílico, é

estabilizada pelas ligações de hidrogênio pelos resíduos Ser⁸³ e Leu¹⁴⁷, que formam o bolsão do oxiânion na lipase *Humicola lanuginosa* (Lawson et al., 1994).

As lipases são especialmente estáveis em solventes orgânicos (Klibanov, 1989; Zaks e Klibanov, 1988). A facilidade com que estas enzimas aceitam uma variedade de substratos não naturais e de tamanhos diversos, sugere que a espinha dorsal polipeptídica é flexível e pode adotar diferentes conformações. Como consequência, a baixa barreira de energia que é necessária para que ocorram mudanças conformacionais dificulta a modelagem e a previsão das interações esteroquímicas para este grupo de biocatalisadores (Sih e Chen, 1989). Outra característica das lipases é de que as esterificações por elas catalisadas em solventes orgânicos são frequentemente mais enantiosseletivas que as reações hidrolíticas correspondentes em água (Chen, et al., 1987; Yamamoto et al., 1988; Bianchi et al., 1988).

O fato de enzimas manterem atividade catalítica em solventes orgânicos não possui explicação simples. A hipótese corretamente aceita é de que, quando a enzima é colocada em um solvente orgânico anidro, esta é cineticamente “congelada” no estado nativo. Isto ocorre em parte devido à baixa constante dielétrica do meio, que produz uma maior efetividade nas forças eletrostáticas responsáveis pela manutenção da estrutura enzimática (Zaks e Klibanov, 1988; Secundo et al., 1992).

Uma maior compreensão sobre os mecanismos de ação de lipases foi obtida a partir da resolução da estrutura cristalina de várias destas enzimas como a da pancreática humana (Winkler et al., 1990), do cavalo (Bourne et al., 1994), do porco (Hermoso et al., 1996); além de lipases fúngicas de *Rhizomucor miehei* (Brady et al., 1990), *Geotrichum candidum* (Schrag e Cygler, 1993), *Humicola lanuginosa* (Derewenda et al., 1994), *Penicillium camembertii* (Derewenda et al., 1994), *Rhizopus delemar* (Derewenda et al., 1994), *Candida rugosa* (Grochulski et al., 1993), *Candida antarctica* (Uppenberg et al., 1994) e de lipases bacterianas de *Chromobacterium viscosum* (Lang et al., 1996) e *Pseudomonas cepacea* (Kim et al., 1997).

I. 6 - Efeito do solvente na enantiosseletividade de lipases

O efeito do solvente sobre a enantiosseletividade das lipases vem sendo objeto de estudo de vários grupos de pesquisa. O solvente pode alterar a especificidade, quimiosseletividade, regioseletividade, seletividade proquiral e enantiosseletividade das lipases e outras hidrolases. Vários modelos foram propostos para explicar a mudança da

seletividade destas enzimas em função do solvente, os quais foram baseados na alteração da flexibilidade conformacional do sítio ativo, na natureza de grupos funcionais do substrato ou de moléculas do solvente para fora ou para dentro das cavidades do sítio ativo, e na estrutura do solvente

Dependo do substrato, estudos revelaram comportamentos diferentes para a mesma enzima, sugerindo a existência de mais de uma possibilidade de ligação do substrato com a superfície da enzima. O evento primário da atividade catalítica das lipases é a ativação interfacial. Existem várias indicações de que a competência catalítica destas enzimas é governada principalmente pela interação entre a tampa do sítio ativo e o meio. Observou-se também que arranjos conformacionais que ocorrem durante a reorganização da tampa causam mudanças estruturais em setores da proteína responsáveis pela ligação do substrato e estabilização dos estados de transição dos intermediários de reação.

Estes indicativos sugerem forte influência da tampa na cavidade de discriminação da enzima por diferentes substratos. A dinâmica destas interações ainda não foi esclarecida. O fato de que o tipo de reorganização molecular, que ocorre devido ao movimento da tampa, varia conforme a lipase é sugestivo de que o solvente afeta estas enzimas segundo um mecanismo particular para cada uma delas (Kaminska *et al.*, 1996).

I. 7 - Variação conformacional induzida por solventes

Quanto ao efeito das características físico-químicas do solvente e da estrutura do substrato sobre a enantiosseletividade das reações catalisadas por lipases em solventes não aquosos, existe uma correlação entre o aumento da enantiosseletividade da enzima e a diminuição do momento de dipolo e da constante dielétrica dos solventes empregados (Fitzpatrick e Klibanov, 1992).

Esta correlação foi interpretada com base no efeito do solvente sobre a mobilidade conformacional da proteína, segundo o modelo de sítio ativo apresentado na Figura 5.

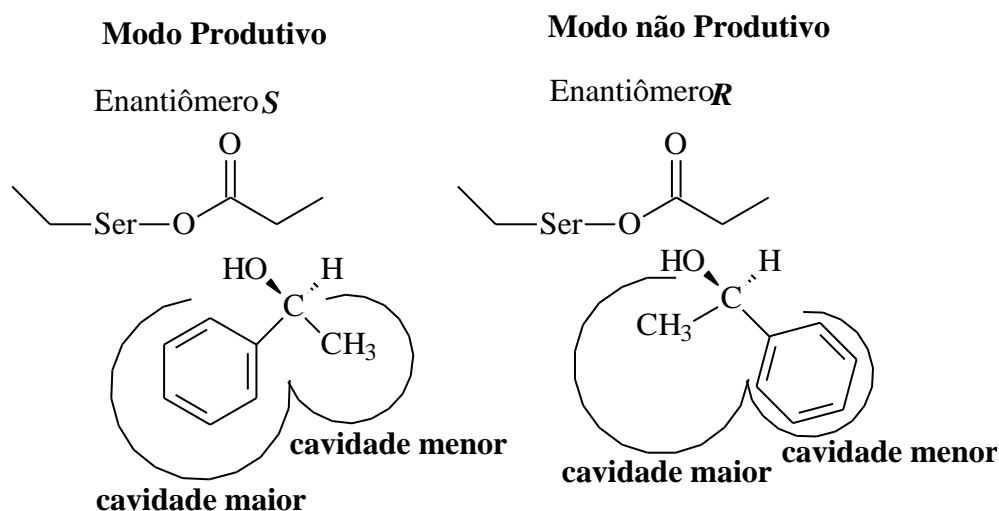


Figura 5. Representação esquemática para os modos de ligação dos enantiômeros *R* e *S* do álcool sec-feniletanol e o sítio ativo da enzima acilada.

Neste modelo o enantiômero *S* do substrato é ligado à enzima segundo uma geometria denominada “modo produtivo”, onde o grupo fenila, mais volumoso, ocupa a cavidade maior e o grupo metila a cavidade menor. Já o enantiômero *R* necessita, para reagir ocupar o sítio de ligação conforme um “modo não produtivo”, isto é, com o grupo fenila ocupando a cavidade menor e o metila a maior. A eficiência enantiosseletiva de processos como o descrito depende da rigidez do sítio ativo. Quando a flexibilidade da proteína aumenta, devido ao aumento da constante dielétrica do solvente, o impedimento estérico exerce menor influência, permitindo um aumento na reatividade do enantiômero *R*, com conseqüente diminuição da estereosseletividade.

I. 8 - Hidrofobicidade do solvente

Dependendo das características estruturais e dos grupos funcionais ligados ao estereocentro, a enantiosseletividade pode estar associada aos efeitos de partição dos grupos funcionais do substrato (Tawaki e Klibanov,1992). Tal efeito foi racionalizado segundo um modelo de afinidade entre os grupos do substrato e solvente (Figura 6). Neste, o “modo produtivo” de ligação representa a situação onde o grupo hidroxila do resíduo serina (Ser) da tríade catalítica está em posição adequada para o ataque nucleofílico sobre o carbono carbonílico do substrato. Conforme aumenta a

hidrofobicidade do solvente, a parte hidrófoba (grupo benzila) da molécula em questão sofre partição para fora do sitio ativo. Este modo favorece a reatividade do enantiômero *R*. em solventes hidrofílicos, o grupo benzila é trocado por um grupo menos lipofílico, sendo que a geometria que o substrato deve adotar neste caso favorece a reatividade do enantiômero *S*.

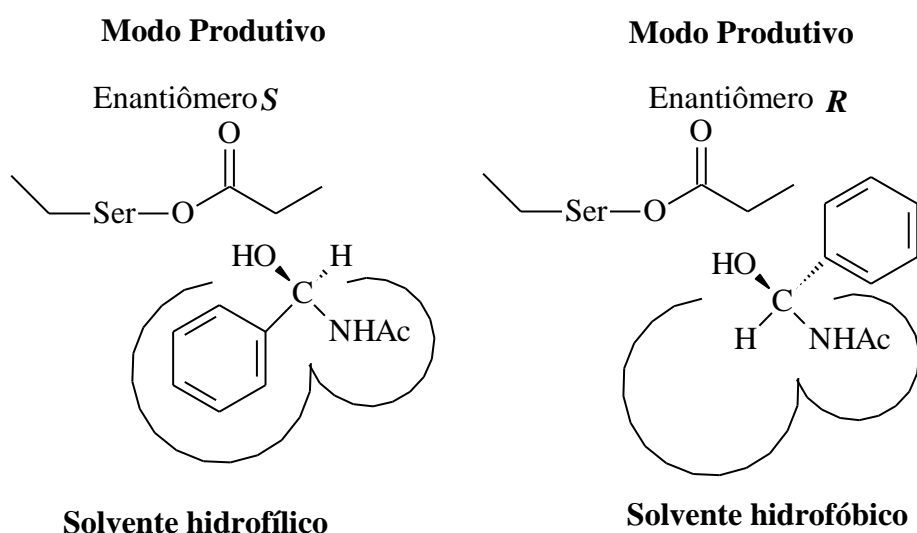


Figura 6. representação esquemática dos modos de ligação dos enantiômeros *R* e *S* ao sítio ativo de *Aspergillus oryzae* (Tawaki e Klibanov, 1992)

I. 9 – A enzima Novozyme 435

Novozyme 435 é uma lipase do tipo *Candida antarctica* (CAL-B) produzida por fermentação submersa de microorganismos *Aspergillus oryzae* geneticamente modificados e suportada sobre resina acrílica macroporosa numa concentração de 3% massa/massa. Essa enzima foi empregada como referência e foi conseguida por doação da Novozymes (Paraná, Brasil). Consiste de partículas com diâmetro na escala de 0,3-0,9 mm, densidade aproximada de 430 kg/m³ contendo 1-2% de água massa/massa.

A atividade de síntese do éster pela enzima NOVOZYME 435 é expressa em unidades de laureato de propila por grama (PLU/g), é descrita no catalogo uma atividade de 10,000 PLU/g.

A lipase é termoestável e particularmente usada na síntese de ésteres e amidas. Novozyme 435 tem sido empregada na resolução de uma grande escala de álcoois primários e secundários, bem como de ácidos carboxílicos.

Nos parâmetros de reação a enzima tem atividade máxima na faixa de 70-80 °C, mas a melhor estabilidade térmica encontra-se na faixa de 40-60 °C.

Quanto ao risco que a enzima apresenta, ela é nociva à pele, olhos e mucosas quando em contato prolongado e neste caso deve-se lavar a região com água por um período longo.

I. 10 - A enzima Lipozyme TL

Lipozyme TL é uma lipase do tipo *Thermomyces lanuginosus*, produzida por fermentação submersa de microorganismos *Aspergillus oryzae* geneticamente modificados, granulado imobilizado retido em 16 mesh com 3% massa/massa. Consiste de partículas com diâmetro na escala de 0,3-0,9 mm, densidade aproximada de 430 kg/m³ contendo 1-2% de água massa/massa.

A atividade de síntese do éster pela enzima Lipozyme TL é expressa em Interestification Units Per Gram (IUN/g), e descrita no catálogo como sendo de 250 IUN/g.

A lipase é termoestável e particularmente usada na síntese e hidrólise de ésteres. Lipozyme TL tem um amplo substrato específico, isto é, promove reações entre uma grande escala de álcoois primários e secundários, bem como, ácidos carboxílicos.

Nos parâmetros de reação a enzima tem atividade máxima na faixa de 70-80 °C, mas a melhor mas a melhor estabilidade térmica encontra-se na faixa de 40-60 °C para ótima produtividade.

Quanto ao risco que a enzima apresenta, a inalação pode provocar sensibilização, podendo causar reações alérgicas em indivíduos sensibilizados. Em contato prolongado com a pele deve-se lavar com água por um período longo.

I. 11 - A Enzima Lipozyme RM

Lipozyme RM é uma lipase do tipo *Rhizomucor miehei*, produzida por fermentação submersa de microorganismos *Aspergillus oryzae* geneticamente modificados, granulado imobilizado.

A atividade de síntese do éster pela enzima LIPOZYME RM é expressa em Interestification Units Per Gram (IUN/g), é descrita no catálogo uma atividade de 150 IUN/g.

A lipase é termoestável e particularmente usada na síntese e hidrólise de ésteres. LIPOZYME RM tem um amplo substrato específico, isto é, promove reações entre uma grande escala de álcoois primários e secundários, bem como, ácidos carboxílicos.

Nos parâmetros de reação a enzima tem atividade máxima na faixa de 70-80 °C, mas a melhor estabilidade térmica encontra-se na faixa de 40-60 °C

Quanto ao risco que a enzima apresenta, a inalação pode provocar sensibilização, podendo causar reações alérgicas em indivíduos sensibilizados. Em contato prolongado com a pele deve-se lavar com água por um período longo.

I.12 - Enzima de *Burkholderia cepacia*

A lipase de *Burkholderia cepacia* foi produzida por fermentação submersa

Após produção e separação das células o meio contendo a enzima foi liofilizado.

A atividade de hidrólise do p-NPP foi de 2,3 U/mg.

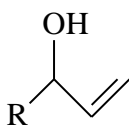
A cepa foi identificada por IRD(ex-ORSTOM), no Laboratório de Microbiologia na Universidade de Provence, Marseille França.

Para os testes de atividade e resolução enzimática foi utilizada uma faixa de temperatura entre 35-39 °C.

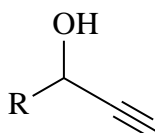
A enzima é estável em solventes hidrofílicos e hidrofóbicos.

I.13 - Álcoois secundários quirais em síntese orgânica

Entre os álcoois secundários que encontram bastante aplicação em síntese orgânica se destacam os alílicos e propargílicos pois podem ser facilmente funcionalizados se constituindo em importantes intermediários frequentemente empregados na síntese de produtos naturais, como compostos biologicamente ativos isolados de plantas e insetos (Kolasa *et al.*, 1996) (Raminelli *et al.*, 2004).



Alcool alílico terminal



Álcool propargílico terminal

Entre os diversos métodos de obtenção de tais compostos de maneira estereosseletiva encontram-se a adição de organometálicos a aldeídos na presença de ligantes quirais (Bouz-Bouz *et al.*, 2000); (Donghyun Lee *et al.*, 2000), adição assimétrica de organozincatos a aldeídos e a rearranjo de epóxidos usando amidas lítio quirais (Mikael *et al.*, 2000); (Nakamura *et al.*, 1995).

O emprego de biocatalisadores tem recebido destaque especial nos últimos anos para a obtenção de álcoois alílicos quirais como na esterificação e hidrólise (Rotticci *et al.*, 1996), (Kita, Y.; *et al.*, 2000), (XU, D.; *et al.*, 2003); (Waldinger *et al.*, 1996), catalisada por lípases, redução assimétrica de cetonas acetilênicas por álcool desidrogenase (Nakamura e Matsuda 1998), (Mori *et al.*, 1980) e hidrólise microbiana.

Existem alguns trabalhos realizados recentemente envolvendo a enzima *Candida antarctica* (CAL-B) reportando sua eficiência na resolução de álcoois secundários como álcoois alílicos e propargílicos, (Xu *et al.*, 2003) justificando assim a aplicação desta enzima no projeto.

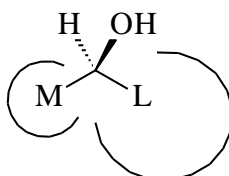
I.14 – Álcoois secundários e enantiosseletividade da enzima

Vários trabalhos foram publicados na tentativa de predição ou explicação de reações envolvendo enzimas e compostos orgânicos em se tratando de enantiosseletividade (Kazlauskas, 2000), (Prelog, 1964).

Kazlauskas testou a enantiosseletividade de várias esterases e lipases realizando testes em mais de 130 ésteres de álcoois secundários baseando-se nos substituintes ligados ao carbono da hidroxila e estereocentro do álcool.

O teste mostrou que, para uma média acima de 93% do grupo de álcoois, a enzima reage mais rapidamente com o enantiômero que apresenta o estereocentro envolvendo a hidroxila voltado para frente na molécula. Isto está em conformidade com Prelog que já havia realizado testes envolvendo *Culvaria lunata* na redução de cetonas e hidrólise de ésteres racêmicos catalisadas por enzimas de *Rhizopus nigrigans*. No teste realizado

Prelog determinou que tanto na hidrólise quanto na acetilação de álcoois secundários a enzima reage mais rapidamente com o enantiômero que apresenta o grupamento contendo o oxigênio voltado para frente da molécula, quando a estrutura é desenhada como na Figura 7.



M = Médio, L = Volumoso

Figura 7. enantiomero que reagiu mais rapidamente com a enzima *Culvaria lunata* e *Rhizopus nigrigans*, conforme testes realizado por Prelog (Prelog, 1964).

OBJETIVOS

O objetivo do presente projeto consistiu em testar a capacidade de três lipases diferentes, de atuarem como agentes de resolução de álcoois acetilênicos secundários, visando à preparação de intermediários quirais para serem empregados em síntese de produtos naturais. As lipases estudadas foram de, *Rhizomucor miehei* (Novozymes), *Thermomyces lanuginosus* (Novozymes) e *Burkholderia cepacia*, sendo as duas primeiras comerciais e a última produzida no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise do Departamento de Química da UFPR. Este estudo foi realizado empregando-se a enzima de *Candida antarctica* lipase (CAL-B, Novozymes), como referência.

Também foi estudada a capacidade da enzima de *Candida antarctica*, de promover a resolução de álcoois alílicos terminais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

III. 1 – Resolução enzimática de álcoois acetilênicos

No início o projeto consistia em testar a capacidade de três lipases diferentes, oriundas dos microorganismos *Burkholderia cepacia*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei*, de atuarem como agentes de resolução de álcoois secundários, visando à preparação de intermediários quirais para serem empregados em síntese de produtos naturais. Este estudo foi efetuado empregando-se a enzima de *Candida antarctica*, da Novozymes, como referência para tais resoluções uma vez que esta enzima já foi muito estudada mostrando-se bastante eficiente em tais reações. O álcool utilizado para os testes foi preparado reagindo-se isovaleraldeído com acetileto de lítio comercial (Acros), utilizando THF como solvente, formando 5-metil-1-hexin-3-ol (Figura 8).

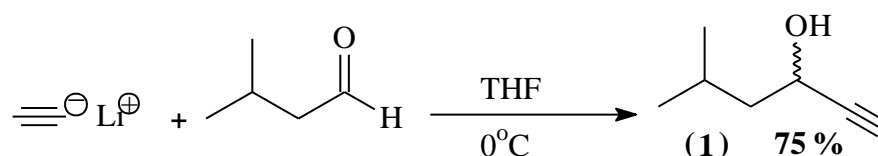


Figura 8 – síntese do álcool 5-metil-1-hexin-3-ol com acetileto de lítio comercial.

O cálculo estequiométrico, utilizado nas resoluções enzimáticas, foi realizado, baseando-se nas atividades das mesmas. Para a caracterização da atividade enzimática, foram utilizadas: enzimas comerciais imobilizadas e produzida no laboratório liofilizada.

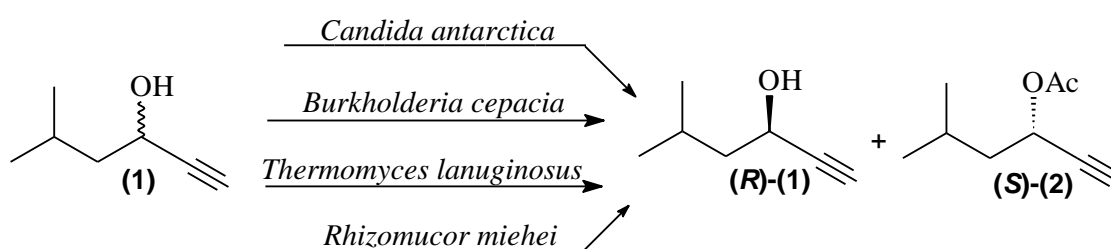
As atividades lipolíticas dos extratos enzimáticos aquosos foram determinadas pelo método da hidrólise do *p*-NPP, os resultados são apresentados na Tabela 3. O melhor resultado para a atividade, obtido pelo do método de hidrólise do *p*-NPP, foi para a enzima *Thermomyces lanuginosus*, com atividade de 178,1 U/mg.

Tabela 3 - Atividades das lipases de *Candida antarctica*, *Burkholderia cepacia*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei*, em meio aquoso.

Enzimas	Atividade(U/mg)
<i>Candida antarctica</i>	31,6
<i>Burkholderia cepacia</i>	2,3
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	178,1
<i>Rhizomucor miehei</i>	0,96

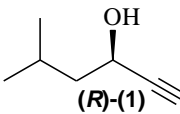
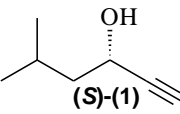
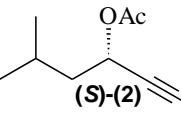
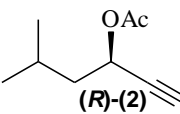
Atividades das lipases de *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei* em suporte, *Burkholderia cepacia* em pó em meio aquoso

Após a determinação da atividade das enzimas, o composto (1) da Figura 9, foi escolhido como modelo para se testar as resoluções enzimáticas, via acetilação do álcool com acetato de vinila na presença das enzimas de *Candida antarctica*, *Burkholderia cepacia*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei* (Figura 9).

**Figura 9** – Resolução enzimática via acetilação com *Candida antarctica*, *Burkholderia cepacia*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei*.

Os testes foram acompanhados por cromatografia gasosa em coluna quiral e os dados referentes a estas resoluções estão mostrados na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da resolução enzimática via acetilação com acetato de vinila.

ENZIMA	TEMPO (hs)	 (R)-(1)	 (S)-(1)	 (S)-(2)	 (R)-(2)
<i>Candida antarctica</i>	1	66 % (33%e.e.)	33 %	99 %	<1 %
	3	88 % (77%e.e.)	11 %	99 %	<1 %
	6	99 %	<1 %	93 % (87%e.e.)	6 %
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	51 % (3%e.e.)	48 %	83 % (67%e.e.)	16 %
	3	52 % (7%e.e.)	47 %	84 % (69%e.e.)	15 %
	30	63 % (27%e.e.)	36 %	82 % (65%e.e.)	17 %
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1	50 % (<1%e.e.)	49 %	57 % (15%e.e.)	42 %
	3	50 % (<1%e.e.)	49 %	64 % (29%e.e.)	35 %
	30	51 % (3%e.e.)	48 %	61 % (23%e.e.)	38 %
<i>Rhizomucor miehei</i>	1	49 %	50 % (<1%e.e.)	Produto<1 %	Produto<1 %
	3	49 %	50 % (<1%e.e.)	Produto<1 %	Produto<1 %
	30	49 %	50 % (<1%e.e.)	Produto<1 %	Produto<1 %

Embora a enzima *Thermomyces lanuginosus* tenha apresentado melhor atividade de hidrólise frente às outras, ela se mostrou pouco eficiente para efetuar a resolução enzimática do composto testado, apresentando baixa velocidade de reação e pouca seletividade na acetilação do álcool. A enzima que obteve menor desempenho, em termos de velocidade de reação e enantiosseletividade, foi a *Rhizomucor miehei* e a de maior desempenho nos mesmos parâmetros, foi a *Candida antarctica*, que em 3 horas de reação gerou 77% de excesso enantiomérico de um dos enantiômeros do álcool e 99% de excesso enantiomérico do outro enantiômero acetilado e em 6 horas, 99% de um dos enantiômeros havia sido consumido. Os valores foram determinados a partir de tempos de retenção e integração das áreas dos picos dos compostos **(1)** e **(2)**, a partir de padrões gerados da reação da mistura racêmica com CAL-B. Nenhuma das enzimas testadas apresentou melhor enantiosseletividade e maior velocidade de reação do que a CAL-B.

III. 2 – Resolução via hidrólise enzimática

Baseando-se nos resultados apresentados na Tabela 4, o de maior atividade na reação de hidrólise verificada para a enzima de *Thermomyces lanuginosus*, e melhor desempenho da enzima de *Candida antarctica*, um outro caminho explorado foi efetuar a

resolução de álcoois secundários envolvendo a esterificação química da mistura racêmica dos álcoois com posterior hidrólise enzimática utilizando-se as duas enzimas.

O éster utilizado para o teste foi preparado, reagindo-se 2-pentanol com anidrido acético, utilizando piridina como solvente, formando acetato de 2-pentila (Figura 10).

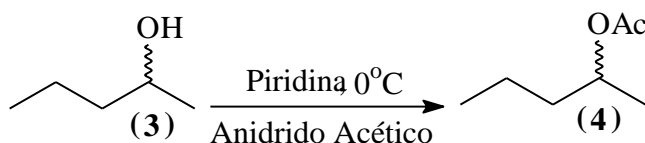


Figura 10 – Preparação do acetato de 2-pentila a partir do 2-pentanol .

Em seguida efetuou-se a resolução de hidrólise enzimática em acetonitrila e água na presença das enzimas de *Thermomyces lanuginosus* e *Candida antarctica* (Figura 11).

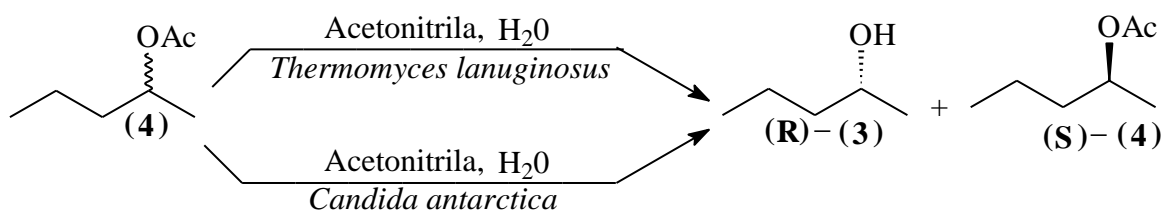


Figura 11 – Resolução de hidrólise enzimática na presença da enzima de *Thermomyces lanuginosus* e *Candida antarctica*

Os testes envolvendo hidrólise enzimática, foram acompanhados por cromatografia gasosa em coluna quiral (Figuras 12 e 13).

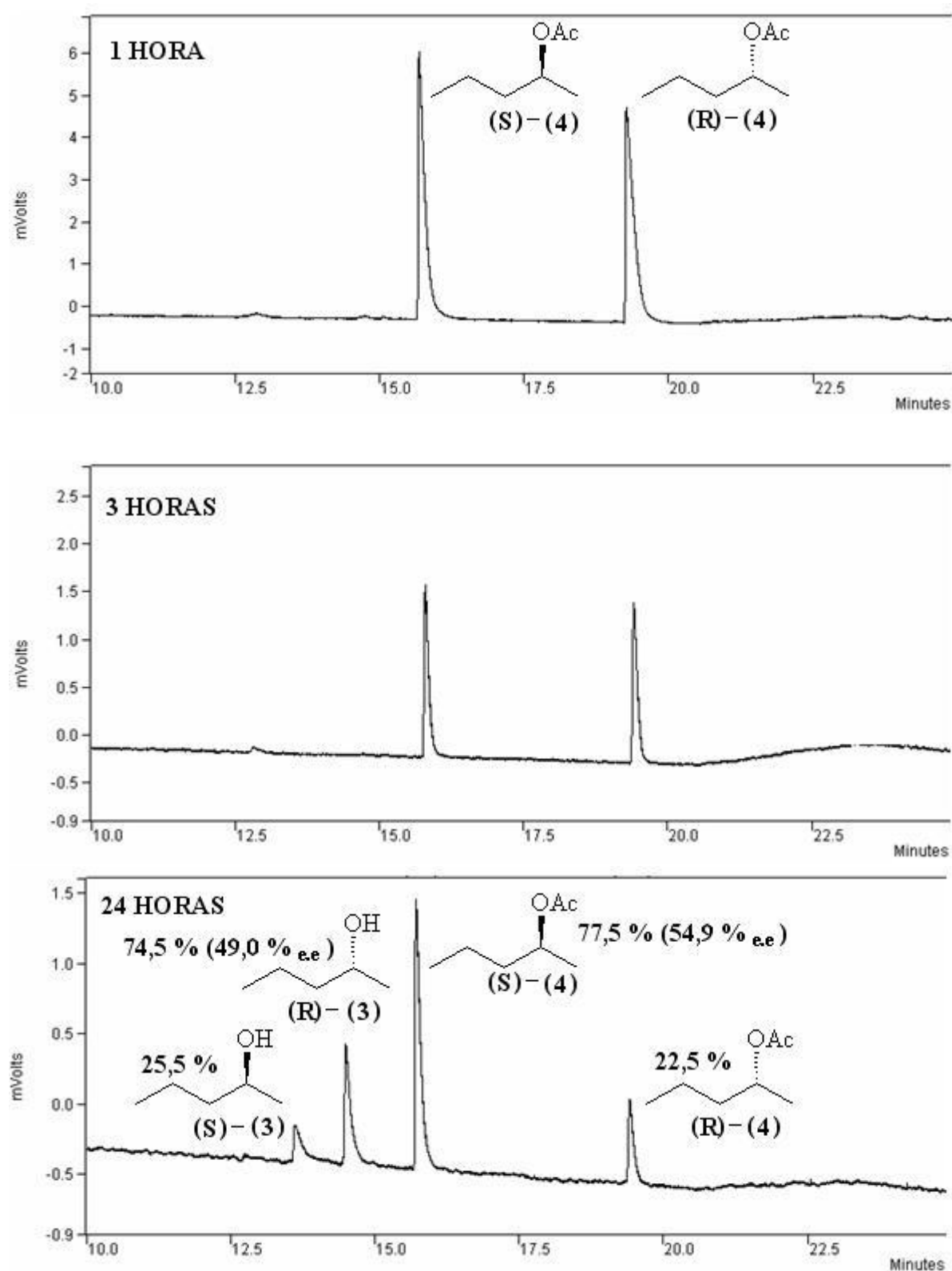


Figura 12 – Resolução via hidrólise enzimática na presença da enzima de *Thermomyces lanuginosus*.

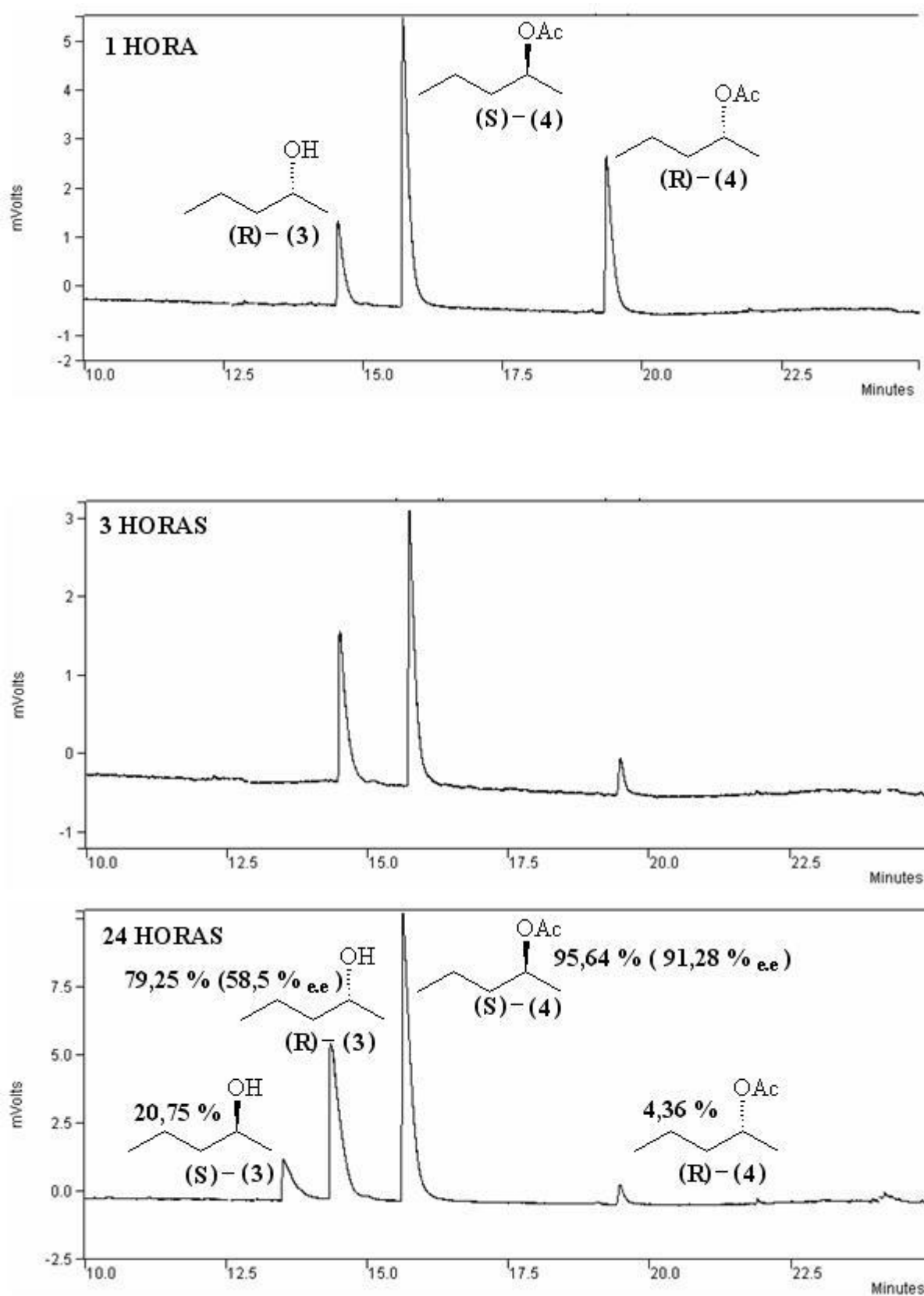


Figura 13 – Resolução via hidrólise enzimática na presença da enzima *Candida antarctica*

A reação de hidrólise realizada com a enzima de *Thermomyces lanuginosus* não mostrou bons resultados com relação à velocidade e seletividade pois em 24h de resolução o éster (*R*) ainda não havia sido totalmente consumido sendo que parte apreciável do éster (*S*) também já havia sido hidrolisado (Figura 12).

Com relação aos testes realizados com a enzima *Candida antarctica*, foram obtidos melhores resultados em relação à velocidade de resolução comparado com a outra enzima, porém quanto à seletividade, os resultados se equipararam a *Thermomyces lanuginosus*, pois em 24h de reação de resolução houve o aparecimento do álcool (*S*), e não houve mais consumo do éster (*R*) (Figura 13).

Posteriormente testou-se a resolução de hidrólise enzimática via *Candida antarctica*, utilizando-se a mistura dos ésteres (*R*)-(2) e (*S*)-(2), numa relação aproximada de 93/7, mistura resultante da esterificação enzimática da molécula (1). Os testes foram acompanhados por cromatografia gasosa em coluna quiral (Figura 14). Este teste foi efetuado para se verificar a possibilidade de se efetuar a esterificação enzimática e obter um dos enantiômeros na forma de álcool com alto excesso enantiomérico e a mistura dos ésteres ser submetida diretamente à hidrólise enzimática e obter o outro álcool em alto excesso enantiomérico.

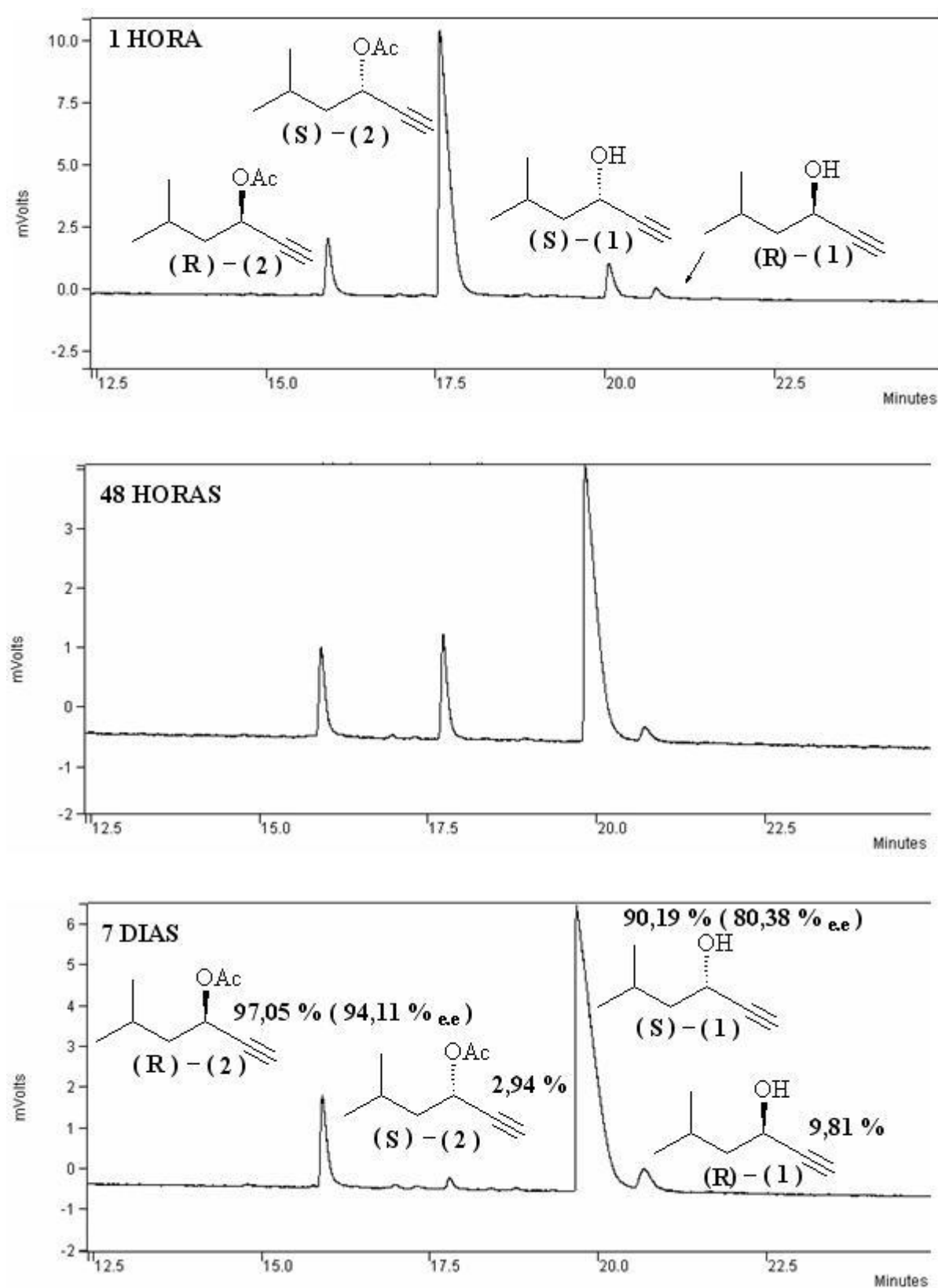


Figura 14 – Resolução de hidrólise enzimática do 1-isobutylprop-2-inil acetato (**2**) na presença da enzima de *Candida antarctica*

Mesmo partindo de uma proporção de 93/7 dos ésteres (*S*) e (*R*), em sete dias de reação a enzima ainda não havia consumido todo o éster (*S*)-(2), tendo já hidrolisado parcialmente seu enantiômero.

III. 3 - Preparação dos álcoois alílicos terminais

De posse dos resultados obtidos até o momento e tendo em vista a dificuldade em se obter as enzimas ainda não estudadas em literatura, fornecidas pelo Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise do Departamento de Química da UFPR, resolveu-se estudar a resolução de álcoois alílicos terminais com a CAL-B, processo ainda não descrito em literatura.

Os álcoois alílicos terminais apresentados na **Tabela 5** foram preparados reagindo os aldeídos correspondentes com cloreto de vinil magnésio comercial (Acros), utilizando THF como solvente (Figura 15).

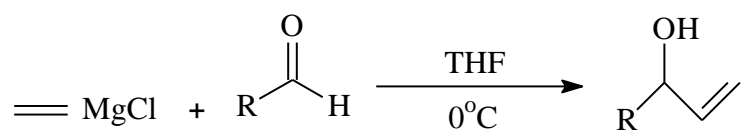


Figura 15 – Preparo dos álcoois alílicos terminais com cloreto de vinil magnésio comercial

Uma mudança efetuada no procedimento descrito em literatura foi o abaixamento da temperatura reacional durante a adição do aldeído ao cloreto de vinil magnésio para -15°C ; estas alterações levaram a um incremento no rendimento das reações (Figura 16).

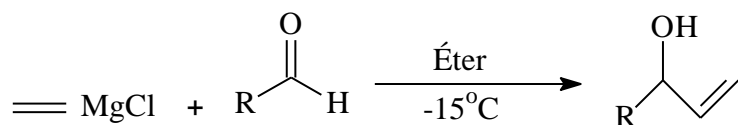


Figura 16 – Preparação dos álcoois alílicos terminais com cloreto de vinil magnésio comercial em éter à baixa temperatura.

Tabela 5- Álcoois alílicos terminais preparados conforme Figuras 15 e 16

Aldeído	álcool alílico	Rend. (%)
		85%
		79%
		80%
		91%
		89%
		87%
		92%

III. 4 - Resolução enzimática dos álcoois alílicos

Para a resolução enzimática via acetilação dos álcoois alílicos seguiu-se o mesmo procedimento dos álcoois acetilênicos, utilizando *Candida antarctica* como enzima, (Figura 17).

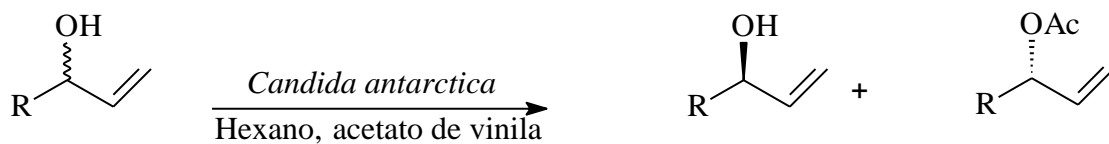


Figura 17 – Resolução enzimática via acetilação com CAL-B

Os testes foram acompanhados por cromatografia gasosa em coluna quiral e os álcoois **(5)** e **(10)** da Tabela 5, foram utilizados como referência para acompanhamento das resoluções dos álcoois alifáticos e aromáticos (Figuras 18 e 19).

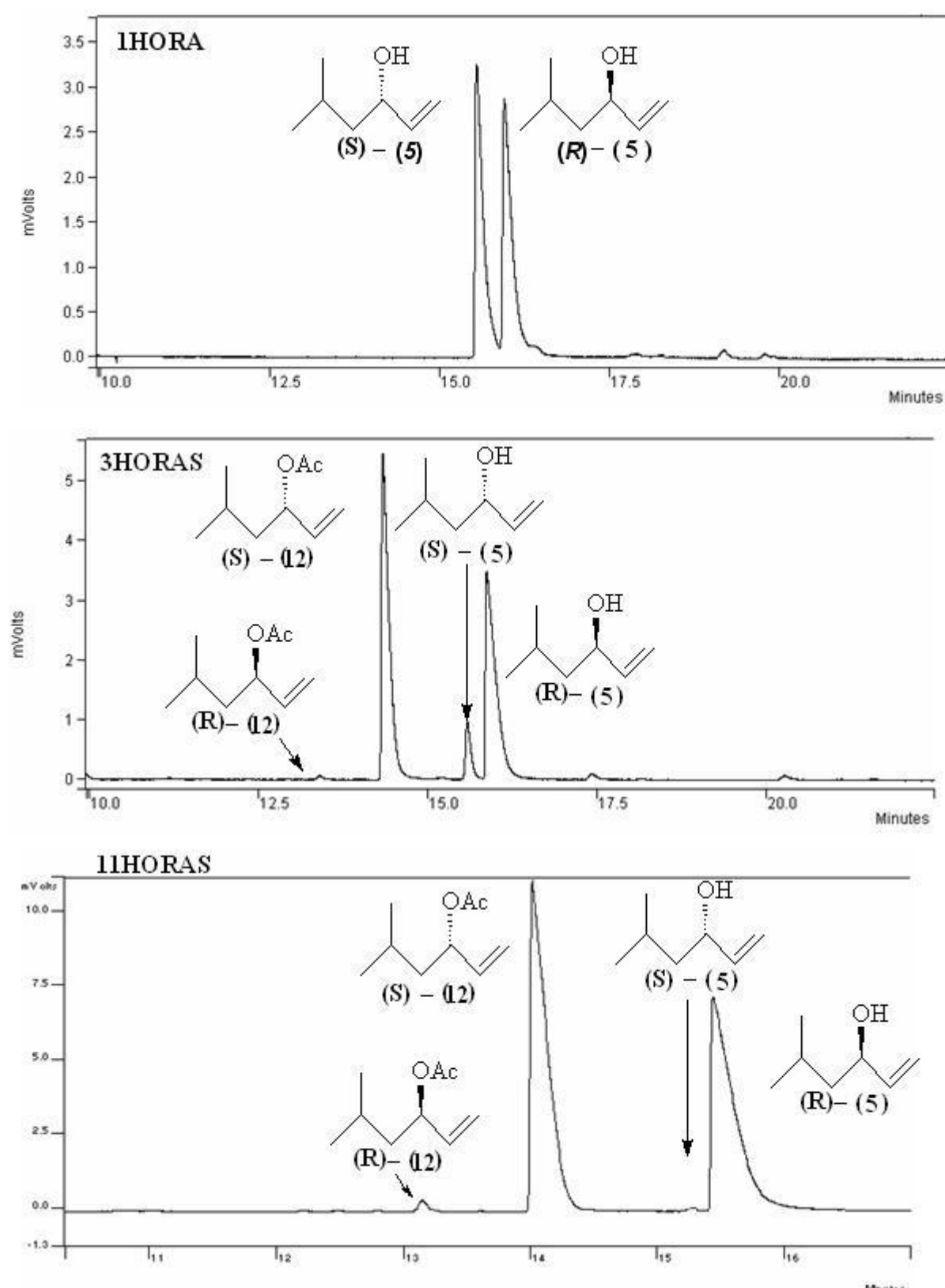


Figura 18 – Resolução enzimática do 5-metilhex-1-en-3-ol (**5**) *Candida antarctica*

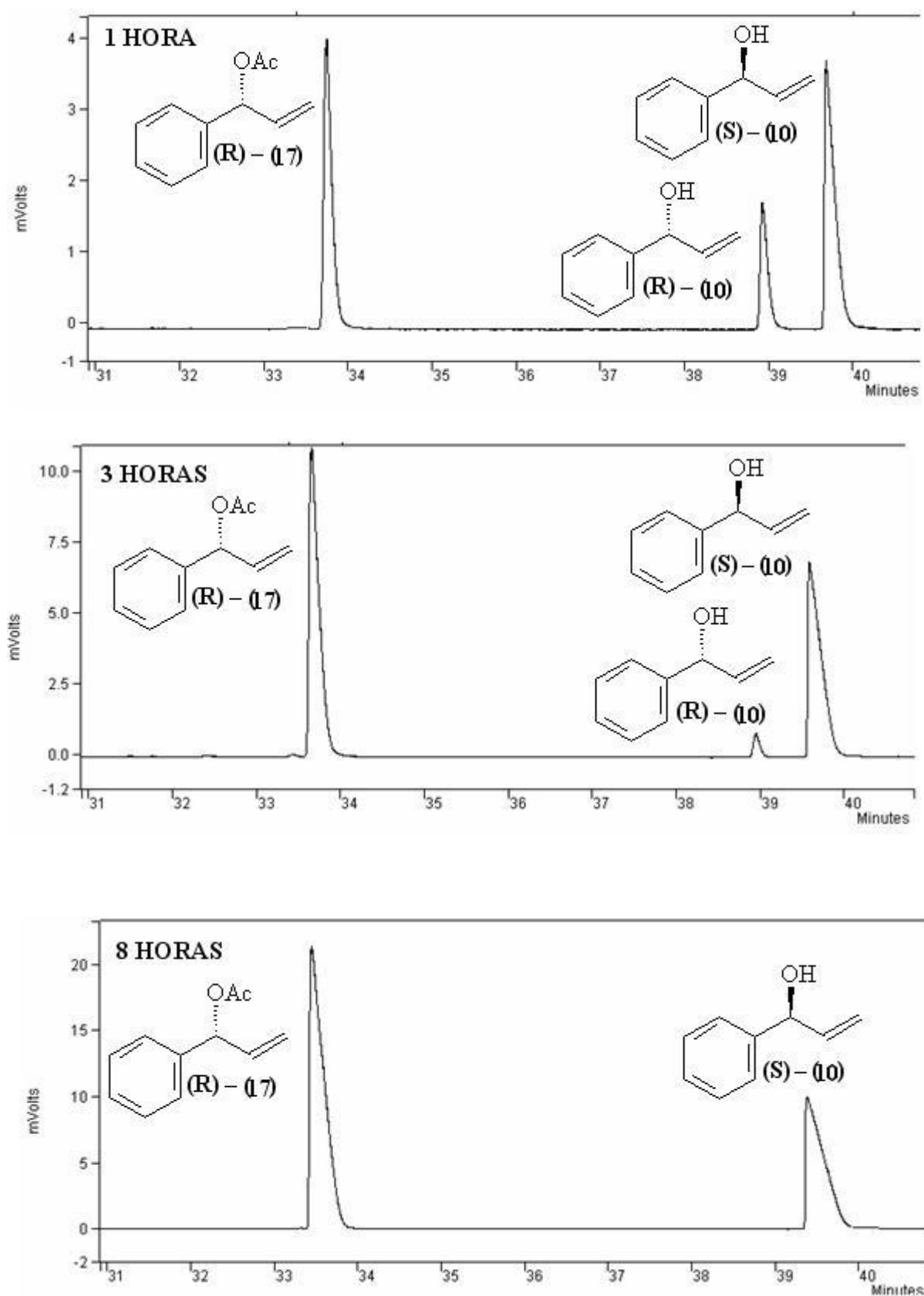
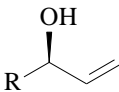
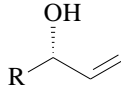
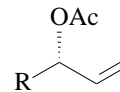
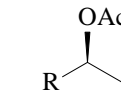
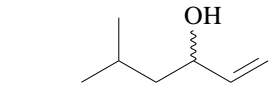
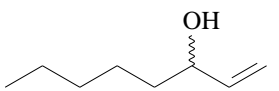
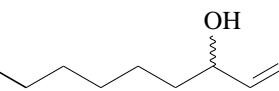
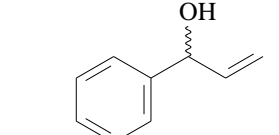
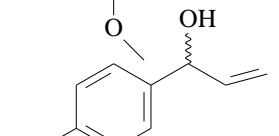
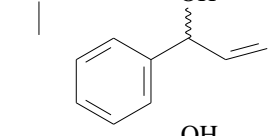
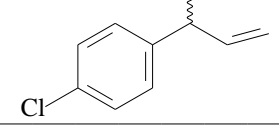


Figura 19 – Resolução enzimática do 1-fenilprop-2-en-1-ol (**10**) com *Candida antarctica*

Os dados referentes a estas resoluções estão mostrados na Tabela 6.

A resolução enzimática dos álcoois alílicos testados ocorreu com boa estereosseletividade, porém a exemplo do que está descrito em literatura (Raminelli et al 2004), a enzima parece ser sensível à diferença química existente entre os radicais conectados ao carbono do grupo hidroxila que está sendo resolvido. A presença de uma cadeia carbônica alifática pequena no composto (5), não presente no composto (10), compromete a seletividade do processo de acetilação enzimática. A resolução enzimática dos álcoois, mostrou uma melhor eficiência em termos de velocidade de reação e enantiosseletividade para as moléculas aromáticas, que em 8 horas de reação consumiu praticamente todo o álcool (R) formando com grande seletividade o éster (R), enquanto ,para a molécula alifática, para se obter um resultado semelhante foram necessários 11 horas de reação. Observou-se um consumo maior que 99% do álcool (S) porém houve uma formação em média 97% do éster (S) com aparecimento de uma porcentagem do éster (R).

Tabela 6 - Resultados da resolução enzimática dos álcoois alílicos via acetilação com acetato de vinila na presença de CALB

ALCOOL	TEMPO (h)				
	11	> 99%	<1%	97% (94%e.e.)	3%
	11	> 99%	<1%	97% (94%e.e.)	3%
	11	> 99%	<1%	97,2% (94,4%e.e.)	2,8%
	8	> 99%	<1%	> 99%	<1%
	8	> 99%	<1%	> 99%	<1%
	8	> 99%	<1%	> 99%	<1%
	8	> 99%	<1%	> 99%	<1%

CONCLUSÕES

Os experimentos realizados neste trabalho envolvendo a síntese dos álcoois e os testes de resolução via esterificação e hidrólise enzimática mostraram que:

A síntese dos álcoois acetilênicos e alílicos racêmicos foram efetuadas com bons rendimentos químicos.

Nenhuma das três enzimas testadas na resolução dos álcoois acetilênicos terminais *Burkholderia cepacia*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei*, apresentaram enantiosseletividade comparada à da enzima comercial *Candida antarctica* B da Novozyme, embora a atividade de hidrólise da *Thermomyces lanuginosus* frente ao *p*-NPP tenha sido maior que a da enzima comercial.

Os testes de resolução via hidrólise envolvendo o acetato de 2-pentila (**4**) e acetato de 1-isobutilprop-2-inil (**2**) apontaram enzima de *Candida antarctica* B como melhor em termos de velocidade, porém em termos de enantiosseletividade ela se equívaleu a enzima de *Thermomyces lanuginosus*, não apresentando uma seletividade elevada.

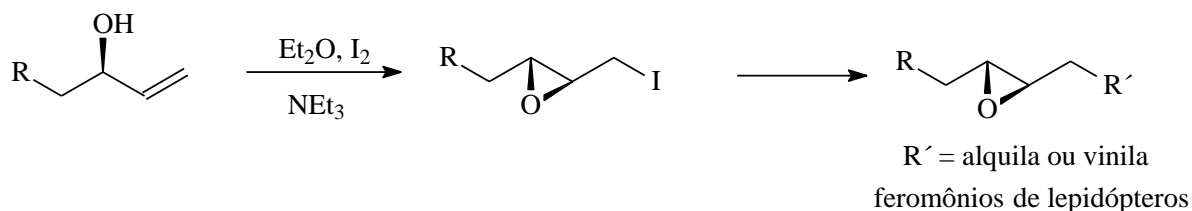
Os resultados envolvendo a resolução enzimática dos álcoois alílicos racêmicos testados mostraram uma melhor eficiência em termos de velocidade de reação e enantiosseletividade para as moléculas aromáticas.

Baseado nos resultados apresentados, pode-se concluir que os objetivos foram alcançados. É importante ressaltar que, a enzima de *Burkholderia cepacia* empregado nos testes não é comercial e que as variáveis do sistema não foram completamente estudadas, logo, os resultados obtidos neste trabalho podem ser considerados bons, porque abrem uma perspectiva de estudo da otimização, visando o aumento na capacidade de resolução desta enzima.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos nas resoluções enzimáticas empregando as enzimas produzidas no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise do Departamento de Química da UFPR indicam a necessidade de se desenvolver estudo sistemático empregando a enzima *Burkholderia cepacia* que apresentou os melhores resultados.

A resolução enzimática dos álcoois alílicos terminais com CALB, resultados inéditos em literatura, abrem perspectivas para um trabalho envolvendo a síntese de β -iodo epóxidos quirais, importantes intermediários a serem explorados principalmente na síntese de feromônios de lepidópteros.



Esquema 13. Aplicação dos álcoois alílicos resolvidos na síntese de feromônios

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

VI. 1 – Aspectos Gerais

Os reagentes e solventes, quando necessário, foram tratados de acordo com procedimentos descritos na literatura (Perrin e Amego, 1988).

Todas as reações foram acompanhadas por análise cromatográfica em coluna capilar quiral, e/ou cromatografia em camada delgada.

Os solventes foram removidos em um evaporador rotatório Buchi, operando a pressão reduzida de (30mmHg).

As análises de cromatografia gasosa foram efetuadas em um cromatógrafo Varian[®] 3800 equipado com duas colunas, uma aquiral: VF-5MS (5%-Phenyl-Methylpolysiloxane) (0,25 mm X 30m) e uma quiral: CHIRASIL-DEX CB- β -ciclodextrin (0,25 mm X 25m) usando Hélio como gás de arraste.

As análises de espectrofotometria de absorção na região do infravermelho foram registradas em equipamento BOMEM MB-100 (DQ-UFPR), as amostras foram preparadas na forma de um filme líquido sobre pastilhas de brometo de potássio (KBr) e as absorções são expressas em número de onda (cm^{-1}).

As análises de atividade enzimática realizadas por espectrofotometria de UV, foram efetuadas em espectrofotômetro HEWLETT PACKARD 8452A[®] DIODE ARRAY SPECTROPHOTOMETER, através do método do p-NPP, utilizando enzimas imobilizadas e liofilizadas (*Burkholderia cepacia*).

As análises de ressonância magnética de hidrogênio e carbono foram efetuadas em um equipamento AVANCE 400 BRUKER, utilizando-se clorofórmio deuterado como solvente.

Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Para indicar a multiplicidade dos sinais, foram adotadas as seguintes abreviações: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), d d (duplo dublete),

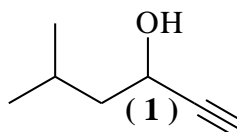
dt (duplo tripleto), dq (duplo quarteto), t (tripleto), td (triplo dupleto), q(quarteto), m (multipleto).

As análises de cromatografia gasosa acoplada a detetor de massas (CG/EM) foram registradas em equipamento Varian® 3800/ SATURN 2000 equipado com coluna do tipo VA-5 (5%-Phenyl-Methylpolysiloxane) (0,25 mm X 30m).

As análises de atividade óptica foram feitas em um polarímetro Rudolph Research modelo ALTOPOL III com λ 589 nm e padrão interno de calibração com leitura $33,9732^{\circ} \pm 0,0001^{\circ}$ com cubeta de comprimento de 1 dm e faixa de concentração 0,1-1,0%.

Nas separações cromatográficas em coluna, utilizou-se sílica gel 230-400 mesh ASTM Merck.

As análises cromatográficas em camada delgada foram efetuadas empregando-se as placas comerciais da MERCK (E. MERCK, tipo 5554, 0,2 mm) as quais foram reveladas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) ou com auxílio de uma solução de vanilina em uma mistura de ácido sulfúrico-etanol (6% vanilina m/v, 4% ácido sulfúrico e 10%, v/v, em etanol) (CHRISMAN, 2004).

VI. 2 – Preparação do 5-metil-1-hexin-3-ol (1).

Em um balão de 250 mL, equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio, pesou-se, sob atmosfera de argônio (“glove bag”), acetileno de lítio (4,62 g, 42,6 mmol), adicionou-se éter (10 mL) e resfriou-se a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Adicionou-se lentamente ao balão reacional isovaleraldeído (3,67 g, 4,6 mL, 42,6 mmol) diluído em éter (10 mL) e deixou-se reagir por 1 hora e 30 minutos, à $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida adicionou-se solução de cloreto de amônio (30 mL), separou-se as fases em funil de separação e extraiu-se a fase aquosa com éter (3 x 30mL). Combinou-se as fases orgânicas, lavou-se com solução saturada de cloreto de sódio (3 x 30mL), secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente em rotaevaporador. Parte do produto foi purificado por coluna cromatográfica usando como eluente a mistura de dicloro metano/éter etílico (95:5, v/v). O rendimento foi de 75% e os dados referentes estão apresentados a seguir.

Análise do composto:

FTIR: filme em pastilha de KBr: cm^{-1} 3350, 2960, 2120, 1653, 1095, 1053, 882

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 170/10 min $^{\circ}\text{C}$ tr = 20,06 e 20,71 (enantiômeros).

VI. 3 – Resolução enzimática do 5-metil-1-hexin-3-ol (1) com *Candida antarctica*

A um erlenmeyer adicionou-se 5-metil-1-hexin-3-ol (0,65mg, 0,5 mmol), de acetato de vinila (0,497g, 5,77mmol) e CAL-B (0,3 g) em hexano anidro (10 mL). A mistura reacional foi agitada em aparelho shaker a uma temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 150 rpm. Foram tiradas alíquotas de 1, 3 e 6 horas. Ao final a mistura foi filtrada e o solvente retirado em evaporador rotatório. O desenvolvimento da reação foi monitorado por cromatografia gasosa em coluna quiral (resultados na **Tabela 4**).

VI. 4 – Resolução enzimática do 5-metil-1-hexin-3-ol (1) com *Burkholderia cepacia*

A um erlenmeyer adicionou-se 5-metil-1-hexin-3-ol (0,65mg, 0,5 mmol), de acetato de vinila (0,497g, 5,77mmol) e *Burkholderia cepacia* (3 g) em hexano anidro (10 mL). A mistura reacional foi agitada em aparelho shaker a uma temperatura de 35 °C e 150 rpm. Foram tiradas alíquotas de 1, 3 e 6 horas. Ao final a mistura foi filtrada e o solvente retirado em evaporador rotatório. O desenvolvimento da reação foi monitorado por cromatografia gasosa em coluna quiral (resultados na **Tabela 4**).

VI. 5 – Resolução enzimática do 5-metil-1-hexin-3-ol (1) com *Thermomyces lanuginosus*

A um erlenmeyer adicionou-se 5-metil-1-hexin-3-ol (0,65mg, 0,5 mmol), de acetato de vinila (0,497g, 5,77mmol) e *Thermomyces lanuginosus* (50mg) em hexano anidro (10 mL). A mistura reacional foi agitada em aparelho shaker a uma temperatura de 35 °C e 150 rpm. Foram tiradas alíquotas de 1, 3 e 6 horas. Ao final a mistura foi filtrada e o solvente retirado em evaporador rotatório. O desenvolvimento da reação foi monitorado por cromatografia gasosa em coluna quiral (resultados na **Tabela 4**).

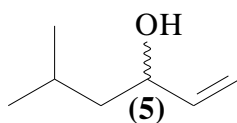
VI. 6 – Resolução enzimática do 5-metil-1-hexin-3-ol (1) com *Rhizomucor miehei*

A um erlenmeyer adicionou-se 5-metil-1-hexin-3-ol (0,65mg, 0,5 mmol), de acetato de vinila (0,497g, 5,77mmol) e *Rhizomucor miehei* (9,g) em hexano anidro (10 mL). A mistura reacional foi agitada em aparelho shaker a uma temperatura de 35 °C e 150 rpm. Foram tiradas alíquotas de 1, 3 e 6 horas. Ao final a mistura foi filtrada e o solvente retirado em evaporador rotatório. O desenvolvimento da reação foi monitorado por cromatografia gasosa em coluna quiral (resultados na **Tabela 4**).

VI. 7 – Procedimento geral de acetilação química dos álcoois secundários

Em um balão de 50 mL, equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio, pesa-se um álcool secundário (1 mmol) em seguida acrescenta-se piridina (5 mL), resfria-se a 0°C. Adiciona-se lentamente anidrido acético (0,30 g, 0,28 mL, 3 mmol) deixando-se em agitação até atingir temperatura ambiente. A reação é monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD), até todo o material de partida ser consumido (aproximadamente 30 minutos). Acrescenta-se acetato de etila (30 mL), transfere-se para um funil de separação, lava-se com sulfato de cobre saturado (3 x 30 mL), em seguida lava-se com solução saturada de cloreto de sódio (2 x 10 mL) e seca-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. Evapora-se o solvente em rotaevaporador. Quando necessário o produto é purificado por cromatografia flash empregando como eluente uma mistura de hexano/acetato de etila (4:1, v/v).

VI. 8 – Preparação do 5-metilhex-1-en-3-ol (5).

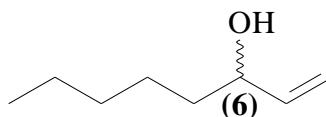


Em um balão 250 mL, equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio, pesou-se, cloreto de vinil magnésio (0,434 g, 5 mmol), adicionou-se éter (30mL) e resfriou-se a -15 °C. Adicionou-se isovaleraldeído (0,430 g, 0,51mL, 5 mmol) diluído em éter (10 mL) e agitou-se a mistura reacional por 90 minutos, à - 15 °C. Em seguida foi adicionada água destilada (30 mL), separou-se as fases em funil de separação e extraiu-se a fase aquosa com éter (3 x 30 mL). Combinou-se as fases orgânicas, lavou-se com solução saturada de cloreto de sódio (3 x 3 mL), secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente em rotaevaporador. Parte do produto foi purificado por coluna cromatográfica usando como eluente a mistura de dicloro metano/éter etílico (95:5, v/v). O rendimento foi de 85% e os dados referentes estão apresentados a seguir.

Análise do composto:

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: 40 °C, 2 °C/min até 170/10 min °C tr = 15,41 min e 15,82 min (enantiômeros).

VI. 9 – Preparação do 1-octen-3-ol (6).



Em um balão 250 mL, equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio, pesou-se, cloreto de vinil magnésio (0,434 g, 5 mmol), adicionou-se éter (30mL) e resfriou-se a -15 °C. Adicionou-se hexanaldeído (0,500 g, 0,60mL, 5 mmol) diluído em éter (10 mL) e agitou-se a mistura reacional por 90 minutos, à - 15 °C. Em seguida foi adicionada água destilada (30 mL), separou-se as fases em funil de separação e extraiu-se a fase aquosa com éter (3 x 30 mL). Combinou-se as fases orgânicas, lavou-se com solução saturada de cloreto de sódio (3 x 3 mL), secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente em rotaevaporador. Parte do produto foi purificado por coluna cromatográfica usando como eluente a mistura de dicloro metano/éter etílico (95:5, v/v). O rendimento foi de 79% e os dados referentes estão apresentados a seguir.

Análise do composto:

RMN ^1H (400 MHz – CDCl_3) δ 0,89 (m, 6H); 1,17-1,47 (m, 6H); 4,08 (ddd, J = 6,4, 2,5 e 1,3 Hz, 1H); 5,10 (ddd, J = 10,4, 1,7 e 1,3 Hz, 1H); 5,23 (ddd, J = 17,1, 2,7, e 1,3, 1H); 5,86 (ddq, J = 16,7, 10,4, 10,3 e 6,2 1H).

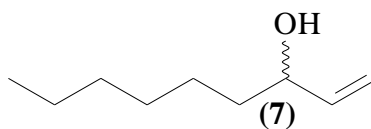
RMN ^{13}C (400 MHz – CDCl_3) δ 14,0; 25,4; 29,31; 31,8; 37,1; 73,2; 141,1; 114,4.

FTIR: filme em pastilha de KBr: cm^{-1} 3565, 3080, 2930, 2851, 1644, 1470, 997, 922.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: 40 °C, 2 °C/min até 170/10 min °C tr = 23,66 min e 23,68 min (enantiômeros).

E.M. m/z (abund. relativa %): 111 (12); 97 (23); 85 (100); 71 (92); 57 (90); 43 (59).

$[\alpha]_D^{20} = +22,7$ (c = 0.7, CHCl_3), e.e. >99%

VI. 10 – Preparação do 1-nonen-3-ol (7).

Em um balão 250 mL, equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio, pesou-se, cloreto de vinil magnésio (0,434 g, 5 mmol), adicionou-se éter (30mL) e resfriou-se a -15°C . Adicionou-se heptanaldeído (0,514 g, 0,60mL, 5 mmol) diluído em éter (10 mL) e agitou-se a mistura reacional por 90 minutos, à -15°C . Em seguida foi adicionada água destilada (30 mL), separou-se as fases em funil de separação e extraiu-se a fase aquosa com éter (3 x 30 mL). Combinou-se as fases orgânicas, lavou-se com solução saturada de cloreto de sódio (3 x 3 mL), secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente em rotaevaporador. Parte do produto foi purificado por coluna cromatográfica usando como eluente a mistura de dicloro metano/éter etílico (95:5, v/v). O rendimento foi de 80% e os dados referentes estão apresentados a seguir.

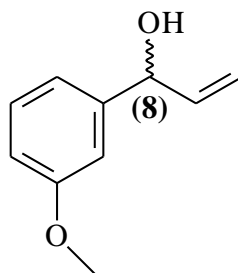
Análise do composto:

RMN ^1H (400 MHz – CDCl_3) δ 0,89 (m, 6H); 1,17-1,47 (m, 6H); 4,08 (ddd, $J = 6,4$, 2,5 e 1,3 Hz, 1H); 5,10 (ddd, $J = 10,4$, 1,7 e 1,3 Hz, 1H); 5,23 (ddd, $J = 17,1$, 2,7, e 1,3, 1H); 5,86 (ddq, $J = 16,7$, 10,4, 10,3 e 6,2 1H).

RMN ^{13}C (400 MHz – CDCl_3) δ 14,0; 22,6; 25,4; 29,31; 31,8; 37,1; 73,2; 141,1; 114,4.

FTIR: filme em pastilha de KBr: cm^{-1} 3563, 3081, 2930, 2852, 1644, 1470, 997, 922.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: 40°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $170^{\circ}\text{C}/10 \text{ min}$ $t_r = 29,18\text{min}$ e $29,41\text{min}$ (enantiômeros).

VI. 11 – Preparação do (*m*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol (8).

Em um balão 250 mL, equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio, pesou-se, cloreto de vinil magnésio (0,434 g, 5 mmol), adicionou-se éter (30mL) e resfriou-se a -15°C . Adicionou-se *m*-anisalaldeído (0,680 g, 0,61mL, 5 mmol) diluído em éter (10 mL) e agitou-se a mistura reacional por 90 minutos, à -15°C . Em seguida foi adicionada água destilada (30 mL), separou-se as fases em funil de separação e extraiu-se a fase aquosa com éter (3 x 30 mL). Combinou-se as fases orgânicas, lavou-se com solução saturada de cloreto de sódio (3 x 3 mL), secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente em rotaevaporador. Parte do produto foi purificado por coluna cromatográfica usando como eluente a mistura de dicloro metano/éter etílico (95:5, v/v). O rendimento foi de 91% e os dados referentes estão apresentados a seguir.

Análise do composto:

RMN ^1H (400 MHz – CDCl_3) δ 3,80 (s, 3H); 5,16 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H); 5,19 (ddd, $J = 10,3, 1,4$ e $1,3$ Hz, 1H); 5,34 (ddd, $J = 17,1, 1,4$ e $1,4$ Hz, 1H); 6,03 (ddd, $J = 17,1, 10,3$, e $6,0$, 1H); 6,82-7,26 (m, 4 H).

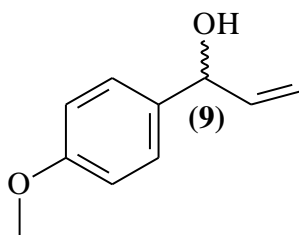
RMN ^{13}C (400 MHz – CDCl_3) δ 55,2; 75,2; 111,7; 113,3; 115,2; 118,6; 129,6; 140,1; 144,3; 159,8.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: 40°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $170^{\circ}\text{C}/10$ min $t_r = 50,79$ min e $51,61$ min (enantiômeros).

FTIR: filme em pastilha de KBr: cm^{-1} 3444, 2931, 2837, 1615, 1447, 960.

E.M. m/z (abund. relativa %): 164 (M^+ , 65); 147 (100); 120 (12); 107 (15).

$[\alpha]_D^{20} = -23,11$ ($c = 0.75$, CHCl_3), e.e. $>99\%$

VI. 12 – Preparação do (*p*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol (9).

Em um balão 250 mL, equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio, pesou-se, cloreto de vinil magnésio (0,434 g, 5 mmol), adicionou-se éter (30mL) e resfriou-se a -15°C . Adicionou-se *p*-anisaldeído (0,680 g, 0,61mL, 5 mmol) diluído em éter (10 mL) e agitou-se a mistura reacional por 90 minutos, à -15°C . Em seguida foi adicionada água destilada (30 mL), separou-se as fases em funil de separação e extraiu-se a fase aquosa com éter (3 x 30 mL). Combinou-se as fases orgânicas, lavou-se com solução saturada de cloreto de sódio (3 x 3 mL), secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente em rotaevaporador, Parte do produto foi purificado por coluna cromatográfica usando como eluente a mistura de dicloro metano/éter etílico (95:5, v/v). O rendimento foi 89% e os dados referentes estão apresentados a seguir.

Análise do composto:

RMN ^1H (400 MHz – CDCl_3) δ 3,78 (s, 3H); 5,11 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H); 5,16 (d, $J = 10,3$ Hz, 1H); 5,31 (d, $J = 17,1$ Hz, 1H); 6,02 (ddd, $J = 17,0, 10,3$ e $5,6$ Hz, 1H); 6,86 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H); 7,26 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H).

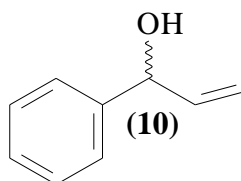
RMN ^{13}C (400 MHz – CDCl_3) δ 55,3; 74,9; 114,0 (2C); 114,7; 127,7 (2C); 134,9; 140,4; 159,1.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: 40°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $170/10$ min $^{\circ}\text{C}$ tr = 51,32 min e 51,63 min (enantiômeros).

FTIR: filme em pastilha de KBr: cm^{-1} 3445, 2931, 2837, 1613, 1446, 960.

E.M. m/z (abund. Relativa %): 164 (M^+ , 100); 147 (62); 121 (52); 109 (62) ; 77 (35).

$[\alpha]_D^{20} = -25,86$ ($c = 1.25$, CHCl_3), e.e. >99%

VI. 13 – Preparação do 1-fenilprop-2-en-1-ol (10).

Em um balão 250 mL, equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio, pesou-se, cloreto de vinil magnésio (0,434 g, 5 mmol), adicionou-se éter (30mL) e resfriou-se a -15°C . Adicionou-se benzaldeído (0,530 g, 0,60mL, 5 mmol) diluído em éter (10 mL) e agitou-se a mistura reacional por 90 minutos, à -15°C . Em seguida foi adicionada água destilada (30 mL), separou-se as fases em funil de separação e extraiu-se a fase aquosa com éter (3 x 30 mL). Combinou-se as fases orgânicas, lavou-se com solução saturada de cloreto de sódio (3 x 3 mL), secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente em rotaevaporador. Parte do produto foi purificado por coluna cromatográfica usando como eluente a mistura de dicloro metano/éter etílico (95:5, v/v). O rendimento foi de 87% e os dados referentes estão apresentados a seguir.

Análise do composto:

RMN ^1H (400 MHz – CDCl_3) δ 5,14 (d, $J = 6,1$ Hz, 1H); 5,16 (ddd, $J = 10,3$, 1,4 e 1,4 Hz, 1H); 5,31 (ddd, $J = 17,1$, 1,4 e 1,4 Hz, 1H); 6,00 (ddd, $J = 17,1$, 10,3 e 6,1 Hz, 1H); 7,27-7,34 (m, 5 H).

RMN ^{13}C (400 MHz – CDCl_3) δ 75,3; 115,1; 126,3 (2C); 127,7; 128,5 (2C); 140,2; 142,6.

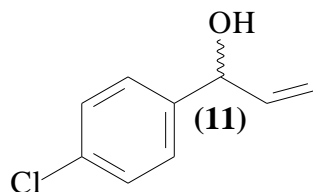
FTIR: filme em pastilha de KBr: cm^{-1} 3357, 3081, 3034, 1646, 1489, 1449, 984.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: 40°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $170/10$ min $^{\circ}\text{C}$ tr = 38,94 min e 39,71 min (enantiômeros).

E.M. m/z (abund. relativa %): 134 (M^+ , 10); 117 (100); 77 (4); 57 (2).

$[\alpha]_D^{20} = -1,4$ ($c = 0,8$, CHCl_3), e.e. >99% { Lit. $[\alpha]_D^{20} = -1,0$ ($c = 3,2$, CHCl_3), e.e. >97 %

(Aldrich, 2003)

VI. 14 – Preparação do *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (11).

Em um balão 250 mL, equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio, pesou-se, cloreto de vinil magnésio (0,434 g, 5 mmol), adicionou-se éter (30mL) e resfriou-se a -15°C . Adicionou-se *p*-clorobenzaldeído (0,703 g, 5 mmol) diluído em éter (10 mL) e agitou-se a mistura reacional por 90 minutos, à -15°C . Em seguida foi adicionada água destilada (30 mL), separou-se as fases em funil de separação e extraiu-se a fase aquosa com éter (3 x 30 mL). Combinou-se as fases orgânicas, lavou-se com solução saturada de cloreto de sódio (3 x 3 mL), secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente em rotaevaporador. Parte do produto foi purificado por coluna cromatográfica usando como eluente a mistura de dicloro metano/éter etílico (95:5, v/v). O rendimento foi de 92% e os dados referentes estão apresentados a seguir.

Análise do composto:

RMN ^1H (400 MHz – CDCl_3) δ 5,15 (d, $J = 6,1\text{ Hz}$, 1H); 5,20 (dd, $J = 10,4$ e $1,3\text{ Hz}$, 1H); 5,32 (dd, $J = 17,0$ e $1,3\text{ Hz}$, 1H); 5,98 (ddd, $J = 17, 0, 10,4$ e $6,1\text{ Hz}$, 1H); 7,28 (d, $J = 8,6\text{ Hz}$, 2 H); 7,32 (d, $J = 8,6\text{ Hz}$, 2 H).

RMN ^{13}C (400 MHz – CDCl_3) δ 74,6; 115,6; 127,7 (2C); 128,6 (2C); 133,4; 139,8; 141,0.

FTIR: filme em pastilha de KBr: cm^{-1} 3357, 3081, 2853, 1646, 1489, 1449, 984.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: 40°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $170/10\text{ min }^{\circ}\text{C}$ tr = 50,79 min e 51,71 min (enantiômeros).

E.M. m/z (abund. Relativa %): 168 (M^+ , 17); 153 (21); 151 (75); 141 (6); 139 (8); 133 (56); 131 (3) 116 (12); 105 (16); 103 (36).

$$[\alpha]_D^{20} = -14,19 \quad (c = 1.9, \text{CHCl}_3), \text{ e.e. } >99\%$$

VI.15 – Acetilação enzimática do 5-metilhex-1-en-3-ol (5) com *Candida antarctica*

A um erlenmeyer adicionou-se (43 mg, 0,5 mmol) de 5-metilhex-1-en-3-ol, acetato de vinila (2,0 mL) e CALB (300mg) em hexano anidro (10 mL). A mistura reacional foi agitada em aparelho shaker a uma temperatura de 31 °C e 180 rpm. Retirou-se alíquotas com o auxílio de seringa descartável após, 1, 3, 5, 8, 11 horas para posterior análise por cromatografia gasosa em coluna quiral para monitoramento. Ao final a mistura foi filtrada e o solvente retirado em evaporador rotatório (resultados na **Tabela 5**).

Análise do composto acetilado:

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: 40 °C, 2 °C/min até 170/10 min °C tr = 50,79 min e 51,71 min (enantiômeros).

VI.16 – Acetilação enzimática do 1-octen-3-ol (6) com *Candida antarctica*

A um erlenmeyer adicionou-se (50 mg, 0,5 mmol) de 1-octen-3-ol, acetato de vinila (2,0 mL) e CALB (300 mg) em hexano anidro (10 mL). A mistura reacional foi agitada em aparelho shaker a uma temperatura de 31 °C e 180 rpm. Retirou-se alíquotas com o auxílio de seringa descartável após, 1, 3, 5, 8, 11 horas para posterior análise por cromatografia gasosa em coluna quiral para monitoramento. Ao final a mistura foi filtrada e o solvente retirado em evaporador rotatório (resultados na **Tabela 5**).

Análise do composto acetilado:

RMN ^1H (400 MHz – CDCl_3) δ 0,89 (m, 6H); 1,17-1,47 (m, 6H); 2,06 (s, 3H) 4,08 (ddd, J = 6,4, 2,5 e 1,3 Hz, 1H); 5,10 (ddd, J = 10,4, 1,7 e 1,3 Hz, 1H); 5,23 (ddd, J = 17,1, 2,7, e 1,3, 1H); 5,86 (dq, J = 16,7, 10,4, 10,3 e 6,2 1H).

RMN ^{13}C (400 MHz – CDCl_3) δ 14,0; 25,4; 29,31; 31,8; 37,1; 73,2; 141,1; 114,4; 154.

FTIR: filme em pastilha de KBr: cm^{-1} 3081, 2931, 2860, 1741, 1646, 1236.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: 40 °C, 2 °C/min até 170/10 min °C tr = 22,12 min e 24,09 min (enantiômeros).

E.M. m/z (abund. Relativa %): 170 (M+, 7); 141 (19); 126 (10); 98 (39); 57 (61).

$$[\alpha]_D^{20} = -40,21 (c = 0.6, \text{CHCl}_3), e.e. 94,0\%$$

VI.17 – Acetilação enzimática do 1-nonen-3-ol (7) com *Candida antarctica*

A um erlenmeyer adicionou-se (51,4 mg, 0,5 mmol) de 1-nonen-3-ol, acetato de vinila (2,0 mL) e CALB (300 mg) em hexano anidro (10 mL). A mistura reacional foi agitada em aparelho shaker a uma temperatura de 31 °C e 180 rpm. Retirou-se alíquotas com o auxílio de seringa descartável após, 1, 3, 5, 8, 11 horas para posterior análise por cromatografia gasosa em coluna quiral para monitoramento. Ao final a mistura foi filtrada e o solvente retirado em evaporador rotatório (resultados na **Tabela 5**).

Análise do composto acetilado:

RMN ^1H (400 MHz – CDCl_3) δ 0,89 (m, 6H); 1,17-1,47 (m, 6H); 2,06 (s, 3H) 4,08 (ddd, J = 6,4, 2,5 e 1,3 Hz, 1H); 5,10 (ddd, J = 10,4, 1,7 e 1,3 Hz, 1H); 5,23 (ddd, J = 17,1, 2,7, e 1,3, 1H); 5,86 (ddq, J = 16,7, 10,4, 10,3 e 6,2 1H).

RMN ^{13}C (400 MHz – CDCl_3) δ 14,0; 22,6; 25,4; 29,31; 31,8; 37,1; 73,2; 141,1; 114,4; 154.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: 40 °C, 2 °C/min até 170/10 min °C tr = 28,20 min e 29,76 min (enantiômeros).

FTIR: filme em pastilha de KBr: cm^{-1} 3081, 2930, 2863, 1743, 1646, 1236

E.M. m/z (abund. Relativa %): 184 (M+,39); 169 (02); 127 (02); 125 (73); 113 (24); 57 (31); 43 (100).

$$[\alpha]_D^{20} = -38,73 (c = 1.55, \text{CHCl}_3), e.e. 94,4\%$$

VI.18 – Acetilação enzimática do (m-metoxifenil)prop-2-en-1-ol (8) com *Candida antarctica*

A um erlenmeyer adicionou-se (68,0 mg, 0,5 mmol) de (*m*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol, acetato de vinila (2,0 mL) e CALB (300mg) em hexano anidro (10 mL). A mistura reacional foi agitada em aparelho shaker a uma temperatura de 31 °C e 180 rpm. Retirou-se alíquotas com o auxílio de seringa descartável após, 1, 3, 5, 8 horas para posterior análise por cromatografia gasosa em coluna quiral para monitoramento. Ao final a mistura foi filtrada e o solvente retirado em evaporador rotatório (resultados na **Tabela 5**).

Análise do composto acetilado:

RMN ^1H (400 MHz – CDCl_3) δ 2,11 (s, 3H); 3,80 (s, 3H); 5,24 (ddd, $J = 10,5, 1,3$ e 1,2 Hz, 1H); 5,29 (ddd, $J = 17,2, 1,3$ e 1,3 Hz, 1H); 5,98 (ddd, $J = 17,2, 10,5$ e 6,0 Hz, 1H); 6,23 (ddd, $J = 6,0, 1,3$ e 1,2 Hz, 1H); 6,84 (ddd, $J = 8,2, 2,6$ e 2,0 Hz, 1H); 6,89 (dd, $J = 2,0$ e 1,9 Hz, 1H); 6,94 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); 7,27 (dd, $J = 8,2$ e 7,6 Hz, 1H);.

RMN ^{13}C (400 MHz – CDCl_3) δ 21,2; 55,2; 76,1; 112,8; 113,5; 116,9; 119,4; 129,6; 136,2; 140,5; 159,8; 170,0.

FTIR: filme em pastilha de KBr: cm^{-1} 2931, 2837, 1735, 1236

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: 40 °C, 2 °C/min até 170/10 min °C tr = 45,72 min e 46,30 min (enantiômeros).

E.M. m/z (abund. Relativa %): 206 (M^+ ,100); 177 (02); 164 (31); 147 (71); 136 (15); 43 (9).

$$[\alpha]_D^{20} = +53,38 \text{ (c = 0.9, CHCl}_3\text{), e.e. >99\%}$$

VI. 19 – Acetilação enzimática do 1-fenilprop-2-en-1-ol (10) com *Candida antarctica*

A um erlenmeyer adicionou-se (53,0 mg, 0,5 mmol) de 1-fenilprop-2-en-1-ol, acetato de vinila (2,0 mL) e CALB (300mg) em hexano anidro (10 mL). A mistura reacional foi agitada em aparelho shaker a uma temperatura de 31 °C e 180 rpm. Retirou-se alíquotas com o auxílio de seringa descartável após, 1, 3, 5, 8 horas para posterior análise por cromatografia gasosa em coluna quiral para monitoramento. Ao final a mistura foi filtrada e o solvente retirado em evaporador rotatório (resultados na **Tabela 5**).

Análise do composto acetilado:

RMN ^1H (400 MHz – CDCl_3) δ 2,11 (s, 3H); 5,24 (ddd, $J = 10,5, 1,3$ e $1,3$ Hz, 1H); 5,29 (ddd, $J = 17,2, 1,3$ e $1,3$ Hz, 1H); 6,00 (ddd, $J = 17,2, 10,5$ e $6,0$ Hz, 1H); 6,26 (ddd, $J = 5,9, 1,3$ e $1,3$ Hz, 1H); 7,31-7,35 (m, 5H).

RMN ^{13}C (400 MHz – CDCl_3) δ 21,2; 76,2; 116,9; 127,1 (2C); 128,2; 128,5 (2C); 136,3; 138,9; 169,9.

FTIR: filme em pastilha de KBr: cm^{-1} 3081, 2931, 2837, 1741, 1583, 1440, 1236.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: 40 $^\circ\text{C}$ 2 $^\circ\text{C}/\text{min}$ até 170/10 min $^\circ\text{C}$ tr = 31,4 min e 32,7 min (enantiômeros).

E.M. m/z (abund. Relativa %): 133 (81); 117 (99); 106 (30); 77 (17); 43 (41).

$$[\alpha]_D^{20} = +3,36 \quad (c = 1.1, \text{CHCl}_3), \text{ e.e. } >99\%$$

VI. 20 – Acetilação enzimática do p-clorofenilprop-2-en-1-ol (11) com *Candida antarctica*

A um erlenmeyer adicionou-se (70,3 mg, 0,5 mmol) de *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol, acetato de vinila (2,0 mL) e CALB (300mg) em hexano anidro (10 mL). A mistura reacional foi agitada em aparelho shaker a uma temperatura de 31 $^\circ\text{C}$ e 180 rpm. Retirou-se alíquotas com o auxílio de seringa descartável após, 1, 3, 5, 8 horas para posterior análise por cromatografia gasosa em coluna quiral para monitoramento. Ao final a mistura foi filtrada e o solvente retirado em evaporador rotatório (resultados na **Tabela 5**).

Análise do composto acetilado:

RMN ^1H (400 MHz – CDCl_3) δ 2,11 (s, 3H); 5,28 (ddd, $J = 17, 1, 1,5$ e $1,2$ Hz, 1H); 5,48 (ddd, $J = 10,5, 1,2$ e $1,2$ Hz, 1H); 5,97 (ddd, $J = 17,1, 10,5$ e $5,9$ Hz, 1H); 6,22 (ddd, $J = 5,9, 1,5$ e $1,2$ Hz, 1H); 7,28 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H); 7,33 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H).

RMN ^{13}C (400 MHz – CDCl_3) δ 21,2; 75,4; 117,3; 128,6 (2C); 128,7 (2C); 134,0; 135,8; 137,4; 169,8.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: 40 $^\circ\text{C}$, 2 $^\circ\text{C}/\text{min}$ até 170/10 min $^\circ\text{C}$ tr = 44,81 min e 45,73 min (enantiômeros).

E.M. m/z (abund. Relativa %): 168 (14); 151 (100); 117 (5); 115 (09); 135 (5); 133 (12); 153 (36); 151(100); 170 (6); 168 (15) .

$$[\alpha]_D^{20} = +28,0 \quad (c = 1.25, \text{CHCl}_3), \text{ e.e. } >99\%$$

VI. 21 – Preparação das amostras para Polarimetria.

Em um balão volumétrico de 10mL de capacidade, pesou-se 20 miligramas da amostra e acrescentou-se clorofórmio (2mL), homogenizou-se e em seguida preencheu-se a cubeta com amostra para leitura no polarímetro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRICH HAND BOOK OF FINE CHEMICALS AND LABORATORY EQUIPMENT 1861,2003.
- ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, G. J.; BARATTI, J. Molecular characterization of gene encoding an esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases. *Biotechnol. Lett.*, **21**, 313-319,1999.
- AIRES-BARROS, M.R. **Extração Líquido-Líquido de Produtos Biológicos: Recuperação de Produtos de Fermentação (Ácidos Carboxílicos) e Proteínas.** Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior Técnico. Lisboa, 1990.
- AKESSON, B.; GRONOWITZ, S.; HERSLOF, B.; MICHELSEN, P.; OLIVECRONA, T. Stereospecificity of different lipases. *Lipids.*, **8**, 313-318, 1983.
- AKOH, C.C. Enzymatic synthesis of acetylated glucose fatty acid esters in organic solvent. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **71**, 319-323, 1994.
- AKOH, C.C. MUTUA, L.N. Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters: Effect of reaction parameters and the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 115-119, 1994.
- ALVARES-MACARIE, E.; BARATTI, J. Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, **10**, 377-383, 2000.
- AMAYA, C.L.; STUBBS, D.; MARAGONI, A.G. A new assay for lipase activity in organic solvents, Lipase-catalyzed synthesis of octyl-linolenate in a hexane microaqueous reaction system. *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 131-135, 1995.
- ANVISA-AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA ([http:// www. anvisa.com.br/](http://www.anvisa.com.br/))
- ANDERSCH, P.; BERGER, M.; HERMANN, J.; LAUMEN, K.; LOBELL, M.; SEEMAYER, R.; WALDINGERE, C.; SCHNEIDER, M. P. Ester synthesis via acyl transfer (transesterification). *Methods Enzymol.*, **286**, 406-443, 1997.
- ASAHARA, T.; MATORI, M.; IKEMOTO, M.; OTTA, Y. Production of two types of lipases with opposite positional specificity by *Geotrichum sp.* FO401B. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57** (3), 390-394, 1993.

- ASSOCIATION OF MANUFACTURERS OF FERMENTATION ENZYME PRODUCTS, **Product Specification novozymes**. Novozymes A/S Denmark, 6, 2002.
- BALCÃO, V.M.; ASMO, K.; MALCATA, F.X.; PAAVO, J.K. Lipase-catalyzed acidolysis of butterfat with oleic acid: Characterization of process and product. *Enzyme Microb. Technol.*, **23**, 118-128, 1998.
- BERGLUND, P.; HUTT, K. Biocalalytic synthesis of enantiopure counponds using lipases. In : Patel, R.N. editor. *Steroselective biocatalysis*. New York, 2000.
- BERTOLINI, M.C.; SCHRAG, J.D.; CYGLER, M.; ZIOMECK, E.; THOMAS, D.U.; VERNET, T. Expression and characterization of *Geotrichum candidum* lipase I gene: comparison of specificity profile with lipase II. *Eur. J. Biochem.*, **228** (3), 863-869, 1995.
- BIANCHI, D.; CESTI, P.; BATTISTEL, E. Anhydrides as acylating agents in lipase-catalyzed stereoselective esterification of racemic alcohols. *J. Org. Chem.*, **53**, 5531-5534, 1988.
- BIER, M.; COLOWIC, S.P.; KAPLAN, N.O. **Lipases, in Methods in Enzymol.** Academic Press, New York , 1, 627-642, 1955.
- BOEL, E.; CHRISTENSEN, T.; WOLDIKE, HL Nucleic acid encoding a recombinant *Humicola sp* lipase. Official Gazette of USA Patent and Trademark Office Patents, **1219**, 3394; 1996.
- BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, **733**, 1-9, 2002.
- BORNSCHEUER, U.T.; KAZLAUSKAS, R. J. Hydrolases en organic synthesis regio- and stereoselective biotransformations. Wiley-VCH, 1999.
- BOURNE, Y.; MATINEZ, C.Ç KERFELEC, B.; LOMBARDO, D.; CHAPUS, C.; CAMBILLAU, C. Horse pancreatic lipase. The crystal structure refined at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **238**, 709-732, 1994.
- BOUZBOUZ, S.; PRADAUX, F.; COSSY, J.; FERROUD, C.; FALGUIERES. .Enantioselective synthesis of propargylic alcohols by addition of enantiopure

- cyclopentadienyldialkoxyallyltitanium complexes to acetylenic aldehydes. *Tetrahedron Lett.*, **41**, 8877-8892, 2000.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantiation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Biochemistry.*, **72**, 248-254, 1976.
- BRADY, L.; BROZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANXEN, L.; JUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. *Nature*, **343**, 767-770, 1990.
- BROWN, E.D.; YADA, R.Y.; MARAGONI, A. The dependence of the lipolytic activity of *Rhizopus arrhizus* lipase on surfactant concentration in Aerosol- OT/isooctane reverse micelles and its relationship to enzyme structure. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1161**, 66-72, 1993.
- BROCKMAN, H. L.; BORGSTROM, B. **General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches.** In: **Lipases.** (Eds.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984.
- CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Reversed micelles in liquid-liquid extraction. In: Kennedy, J.F. and Cabral, J.M.S. (Eds). *Recovery Process for Biobycal Materials.* U.K: John Wiley & Sons, **6**, 247-271, 1993.
- CAJAL, Y.; SVENDSEN, A.; DE BOLÓS, J.; PATLAR, S.A.; ALSINA, M.A. Effect of the lipid interface on the catalytic activity and spectroscopic of a fungal lipase. *Biochimie.*, **82**, 1053-1061, 2000b.
- CARDENAS, J.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; SINISTERRA, J.V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, **14**, 111-123, 2001.
- CARLILE, K.; REES, G.; ROBINSON, B.G.; STEER, T.D.; SVENSSON, M. Lipase-catalyzed interfacial reactions in reverse micellar systems. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **92**, 4701-4708, 1996.

- CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Studies on the extraction and back-extraction of a recombinant cutinase in a reversed micellar extraction process. *Bioprocess Eng.*, **11**, 203-208, 1994.
- CARVALHO, C.M.L.; TAIPA, M.A.; CABRAL, J.M.S. Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochimie.*, **82**, 1063-1085, 2000a.
- CARVALHO, C.M.L.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. kinetic of cutinase catalyzed transesterification in AOT reversed micelles: modeling of a batch stirred tank reactor. *J. Biotechnol.*, **81**, 1-13, 2000b.
- CARVALHO, C.M.L.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Cutinase stability in AOT reversed micelles: system optimization using the factorial design methodology. *Enzyme Microb. Technol.*, **24**, 569-576, 1999.
- CASTELLAR, M.R.; TAIPA, M.A.; CABRAL, J.M.S. Kinetic and stability characterization of *Chromabacterium viscosum* lipase, and its comparison with *Pseudomonas glumae* lipase. *Appl. Biochem. Biotech.*, **61** (3), 299-314, 1996.
- CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A. Fine Chemicals by biotransformation using lipases: revisão. *Quimica Nova.*, **18** (6), 544-554, 1995.
- CASTRO, M.J.M.; CABRAL, J.M.S. Stability of hydrogenase in AOT reversed micelles. *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 668-672, 1989.
- CASTRO, M.J.M.; CABRAL, J.M.S. Reversed micelles in biotechnological processes. *Biotec. Adv.*, **6**, 151-167, 1988.
- CHANCE, D.L.; GERHARDT, K.O.; MAWHINNEY, T.P; Gas-liquid chromatography-mass spectrometry of hydroxy fatty acids as their methyl esters ter-butyldimethylsilyl ethers. *J. Chromatogr. A.*, **793**, 91-98, 1998.
- CHAN, K. K.; COHEN, N.; DE NOBLE, J. P.; SPECIAN JR., A.C.; SAUCY, G. Synthetic Studies on (2*R*,4'*R*.8'*R*)- α -Tocopherol. Facile Syntheses of Optically Active, Saturated , Acyclic Isoprenoids via Stereospecific (3,3) Sigmatropic Rearrangements. *J. Org. Chem.*, **41**, 3497-3505, 1976.

- CHANG, P.S.; RHEE, J.S. Characteristics of *Chromabacterium viscosum* lipase-catalysed glycerolysis of triglycerides in AOT-isooctane reversed micelles. *Biocatalysis.*, **4**, 253-335, 1990.
- CHANG, P.S.; RHEE, J.S. Characteristics of lipase-catalysed glycerolysis of triglycerides in AOT-isooctane reversed micelles. *Biocatalysis.*, **3**, 343-355, 1990.
- CHATTOPADHYAY, M.; BANIK, A.K.; RAYCHAUDKURI, S. Production and purification of lipase by mutant strain of *Rhizopus arrhizus*. *Folia Microbiologica.*, **44**, (1), 37-40, 1999.
- CHEN, C-S.; GIRDAUDAS, G.; WU, S-H.; SIH, C. J. Quantitative analyses of biochemical Kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7294-7299, 1987.
- CHEN, JYH-PING.; CHANG, KO-CHANG. Lipase-catalyzed Hydrolysis of Milk in Lecithin Reverse Micelles. *J. Ferm. Bioeng.*, **76** (2), 98-104, 1993.
- CHO, B.T., and KIM, D.J. Efficient synthesis of (*R*)- and (*S*)-3-octanol, (*R*)-2-dodecanol, (*R*)-2-methyl-4-heptanol and (*R*)-2-methyl-4-octanol: the pheromones of *Myrmica scabrinodis*, *Crematogaster castanea*, *C. liengmei*, *C. auberti* and *Metamasius hemipterus*. *Tetrahedron.* **59**, 2457-2462, 2003.
- CHOWDARY, G.V.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Enzymatic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: a multivariate analysis. *Process Biochem.*, **36**, 331-339, 2001.
- CHRISMAN, W. – **Stannyldienynes for Steroselective Retinoid Synthesis.** (Tese de Doutorado) – Santa Barbara – California 2004.
- COREY, E.J.; CHENG, X-M. **The logic of Chemical Synthesis.** – John Wiley e Sons, 1989.
- COSTA, V.E.U.; AMORIM, H.L. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova*, **22** (6), 863-864, 1999.
- CREAGH, A.L.; PRAUSNITZ, J.M.; BLANCH, H.W. Structural and catalytic properties of enzyme in reverse micelles. *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 383-392, 1993.

- CROOKS, G.E.; REES, G.D.; ROBINSON, B.H.; SVENSSON, M.; STEPHENSON, G.R. Comparison of Hydrolysis and Esterification behavior of *Humicola lanuginosa* and *Rhizomucor miehei* lipases in AOT-Stabilized water-in-oil microemulsions: I. Effect of pH and water content on reaction kinetics. *Biotechnol. Bioeng.*, **48**, 78-88, 1995a.
- CROOKS, G.E.; REES, G.D.; ROBINSON, B.H.; SVENSSON, M.; STEPHENSON, G.R. Comparison of Hydrolysis and Esterification behavior of *Humicola lanuginosa* and *Rhizomucor miehei* lipases in AOT-Stabilized water-in-oil microemulsions: II. Effect of temperature on reaction kinetics and general considerations of stability and productivity.. *Biotechnol. Bioeng.*, **48**, 190-196, 1995b.
- CUNNAH, P.J.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Esterification and transesterification catalyzed by cutinase in reverse micelles of CTAB for the synthesis of short chain ester. *Biocatal. Biotrans.*, **14**, 125-146, 1996.
- CYGLER, M.; GROCHLSKI, P.; KAZLAUSKAS, R. J.; SCHRAG, J. D.; BOUTILLIER, F.; RUBIN, B.; SERREGI, A. N.; GUPTA, A. K. A Structural Basis for the Chiral Preference of Lipases. *J. Am. Soc.* **116**, 3180-3186, 1994.
- CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. *Methods Enzymol*, **284**, part A, 3-27, 1997.
- DAVIS, B. G.; BOYLER, V. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 618-640, 2001.
- DEEVER, A.M.T.J. **Mechanism of activation of lipolytic enzymes.** Tese de Doutoramento. Rijksuniversiteit Utrecht, 1992.
- DEKKER, M.; HILHORST, R.; LAANE, C. Isolating enzymes by reversed micelles. *Anal. Biochem.*, **178**, 217-226, 1989.
- DEL RIO, J.L.; CAMINAL, G.; FITÉ, M.; FAUS, I.; BLADÉ, J.; SOLÁ, C. Lipase-catalysed synthesis of natural ethanol esters: effect of water removal on enzyme reutilisation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **75**, 991-996, 2000.

- DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; GREEN, R.; WEI, Y.; DODSON, G. G.; YAMAGUCHI, S.; HAAS, M. J.; DEREWENDA, Z. S. An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases. *Nat. Struc. Biol.*, **1**, 36-47, 1994.
- DESNUELLE, P.; BOYER, P. D. – **The Enzymes**. *Academic Press, New York*, **7**, 575-616, 1972.
- DONGHYMN LEE, EUN A. HUH, MAHN-JOO; HYUN, MIN, JUNG; JEONG, HWAN, KOH; JAIWOOK, PARK. Dynamic kinetic resolution of Allylic Alcohols mediated by ruthenium and lipase- based catalysts. *Organic letters*, **15**, 2377-2379, 2000.
- DORDICK, J.S. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 194-211, 1989.
- DUCRET, A.; TRANI, M.; LORTIE, R. Lipase catalysed enantioselective Esterification of ibuprofen in organic solvent under controlled water activity. *Enzyme Microb. Technol.*, **22**, 212-216, 1998.
- EGLOFF, .P.; RANSAC, S.; MARGUET, F.; ROGALSKA, E.; VAN TILBEURGH, H.; BUONO, G.; CAMBILLAU, C.; BERGER, R. Les lipases: cinétiques, spécificités et aspects structuraux. In Malcata, F.X. (Ed). *Engineering of/with lipases..* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.
- ESSAMRI, M.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents . *J. Biotechnol.*, **60**, 97-103, 1998.
- FERRATO, F.; CARRIERE, F.; SARDA, L.; VERGER, R. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods Enzimol.*, **284**, part B, 327-347, 1997.
- FITZPATRICK, P. A.; KLIBANOV, A. M. Computer-assisted modeling of subtilisin enantioselectivity in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 735-742, 1992.
- GOTOR, V. Non-conventional hydrolase chemistry: amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 2189-2197, 1999.

- GROCHULSKI, P.; LI, Y.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; SMITH, P.; HARRISON, D.; RUBIN, B.; CYGLER, M. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* **268**, 12843-12847, 1993.
- HERMONO, J.; PIGNOL, D.; KERFELEC, B.; CRENON, I.; CHAPUS, C.; FONTECILLA-CAMPS, J. C. Lipase Activation by Nonionic Detergents The crystal structure of the porcine lipase-coplipase-tetraethylene glycolmonooctyl ether complex. *Biol. Chem.*, **271**, 18007-18016, 1996.
- HERSCHLAG, D. The role of induced fit and conformational-changes of enzymes in specificity and catalysis. *Bioorg. Chem.* **10**, 62-96, 1987.
- HOLMQUIST, M.; CLAUSEN, I.G.; PETKAR, S.; SVENDSEN, A.; HULT, K. Probing a functional role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase through transesterification reactions in organic solvent. *J. Protein. Chem.* **14**, 217-224, 1995.
- ITOH, T.; TAKAGI, Y.; TSUKUBE, H. Synthesis of Chiral Building Block for Organic Synthesis via Lipase-Catalyzed Reaction: New Method of Enhancing Enzymatic Reaction Enantioselectivity. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **3**, 259-270, 1997.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, **16**, 396-403, 1998.
- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; HERTZ, M. T. Bacterial biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* , **53**, 315-351, 1999.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 390-397, 2002.
- FENSEN, R.G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids.*, **18**, 650-657, 1983.
- JESUS, P.C.; JOÃO, J.J.; SILVA, P.L.F.; BURLIN G.; NASCIMENTO, M.G Organogel: um novo sistema para a imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica. *Química Nova.*, **20(6)**, 664-672, 1997.

- HAEGER, K. E.; RANSACK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.*, **15**, 29-63, 1994.
- KAZLAUSKAS, R. J.; HEDDA, K. WEBER. Improving hydrolases for organic synthesis. *Current opinion in chemical biology*, **2**, 121-126, 1998.
- KAZLAUSKAS, R. J. Molecular modeling and biocatalysis: explanations, predictions, limitations and opportunities. *Current opinion in chemical biology*, **4**, 81-88, 2000.
- KAMINSKA, J.; GÓRNICKA, I.; SIKORA, M.; GÓRA, J. Preparation of Homochiral (S)- and (R)-1-(2-Furyl)ethanols by Lipase-Catalyzed Transesterification. *Tetrahedron Asym.*, **7**, 907-911, 1996.
- KIM, K. K.; SONG, H. K.; SHIN, D. H.; HWANG, K. Y.; SUH, S. W. The Crystal Structure of a Triacylglycerol Lipase from *Pseudomonas cepacia* Reveals a Highly Open Conformation in the Absence on a bound Inhibitor. *Structure*, **5**, 173-185, 1997.
- KITA, YASUYUKI; TAKEBE, YASUSHI; MURATA, KENJI; NAKA, TADAATSU; AKAI, SHUJI. Convenient Enzymatic Resolution of Alcohols Using Highly Reactive, Nonharmful Acyl Donors, 1-Ethoxyvinyl Esters. *J. Org. Chem.* **65**, 83-90, 2000.
- KITAGUCHI, H.; FITZPATRICK, P. A.; HUBER, J.E.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic resolution of racemic amines: crucial role of the solvent. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3094-3095, 1989.
- KITAGUCHI, H.; ITOH, I.; ONO, M. Effects of water and water-mimicking solvents on the lipase-catalyzed esterification in an apolar solvent. *Chem. Lett.*, **18**, 1203-1306, 1990.
- KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem Sci.*, **14**, 141-144, 1989.
- KOLASA, T.; STEWART, A. O.; BROOKS, C. D. W. Asymmetric synthesis of (R)-N-3-butyn-2-yl-N-hydroxyurea, a key intermediate for 5-lipoxygenase inhibitors. *Tetrahedron Asymmetry*, **3**, 729, 1996.
- KRIEGER, N.; TAIPA, M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Purification of the lipase from *Penicillium citrinum* by chromatographic process. *Bioprocess Eng.*, **20**, 59-65, 1999.

- KRIEGER, N.; TAIPA, M.A.; FONTANA, J.D.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L.; M.R.; CABRAL, J.M.S. Kinetic characteristics of from *Penicillium citrinum* lipase in AOT/isooctane reversed micelles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67** (1-2), 85-87, 1999.
- KRIEGER, N. Produção, Purificação e Caracterização de Lipases de *Penicillium citrinum*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 1995.
- KRISHNA, S. H.; MANOHAR, B.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *J. Biotechnol.*, **87**, 191-201, 2001a.
- KRISHNA, S. H.; KARANTH, N.G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A kinetic study. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1547**, 262-267, 2001b.
- KRISHNA, S. H.; MANOHAR, B.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G. Optimization of isoamyl acetate production by using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* by response surface methodology. *Enzyme. Microb. Technol.*, **26**, 131-136, 2000.
- LANG, D.; HOFMANN, B.; HAALCK, L.; HECHT, H. J.; SPENER, F.; SCHMID, R.D.; SCHOMBURG, D. Crystal Structure of a Bacterial Lipase from *Chomabacterium viscosum* ATCC 6918 Refined at 1.6 Å Resolution. *J. Biol. Chem.*, **259**, 704-709, 1996.
- LAWSON, D. M.; BRZOZWSKI, A. M.; RETY, S.; VERMA, C.; DODSON, G. G. Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modeling. *Protein Eng.* **7**, 543-550, 1994.
- LAZLÓ, P.; NOVÁK, L. **Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach**. VHC, Weinheim, 1992.
- LEBLANC, D.; MORIN, A.; HU, D.; ZHANG, X.M.; BISAILLON, J.G.; PAQUET, M.; DUBEAU, H. Short chain fatty acid esters synthesis by commercial lipases in low-water systems and by resting microbial cells in aqueous medium. *Biotechnol. Lett.*, **20**, 1127-1131, 1998.
- LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. **Industrial biotransformation**. Weinheim: Wiley-VCH, 2000.

- LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **53**, 470-472, 1976.
- MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M. Lipases microbianas na produção de ésters formadores de aroma. *Ciência Tecnol. Alimentos*, **17(2)**, 115-119, 1997.
- MIKAEL, J. SONDERGREN; SOPHIE, K. BERTILSSON; PHER, G. ANDERSSON. Allylic Alcohols via Catalytic Asymmetric Epoxide Rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6610-6618, 2000.
- MORI, K.; AKAO, H. Synthesis of Optically Active Alkynyl Alcohol and α -Hydroxy Esters by Microbial Asymmetric Hydrolysis of the Corresponding Acetates. *Tetrahedron*, **36**, 91-96, 1980.
- NAGAYAMA, K.; MATSU-URA, SYN-ICHI.; DOI, T.; IMAI, M. Kinetic characterization of esterification catalyzed by *Rhizopus delemar* lipase in lecithin-AOT microemulsion system. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, **4**, 25-32, 1998.
- NAKAMURA, K.; KINOSHITA, M.; OHNO, A. Structure of solvent affects enantioselectivity of lipase-catalyzed transesterification. *Tetrahedron*, **51**, 8799-8808, 1995.
- NAKAMURA, K.; TAKEBE, Y.; KITAYAMA, T.; OHNO, A. Effect of solvent structure on enantioselectivity of lipase-catalyzed transesterification. *Tetrahedron*, **32**, 4941-4944, 1991.
- NAKAMURA, K.; MATSUDA, T. Asymmetric Reduction of Ketones by the Acetone Powder of *Geotrichum candidum*. *J. Org. Chem.*, **63**, 8957-8965, 1998.
- NINI, L.; SARDA, L.; LOUIS-CLAUDE, C.; BOITARD, E.; JEAN-PAUL, D.D.; CHAHINIAN, H. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a Kinetic study. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1534**, 34-44, 2001.
- NOBLE, M. E. M.; CLEASBY, A.; JOHNSON, L. N.; EGMOND, M. R.; FRENKEN, L. G. J. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.* **331**, 123-128, 1993.
- OSÓRIO, N.M.; FERREIRA-DIA, S.; GUSMAO, J.H.; FONSECA, M.N.R. Response surface modelling of the production of ω -3 polyunsaturated fatty acids-enriched

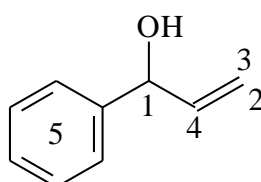
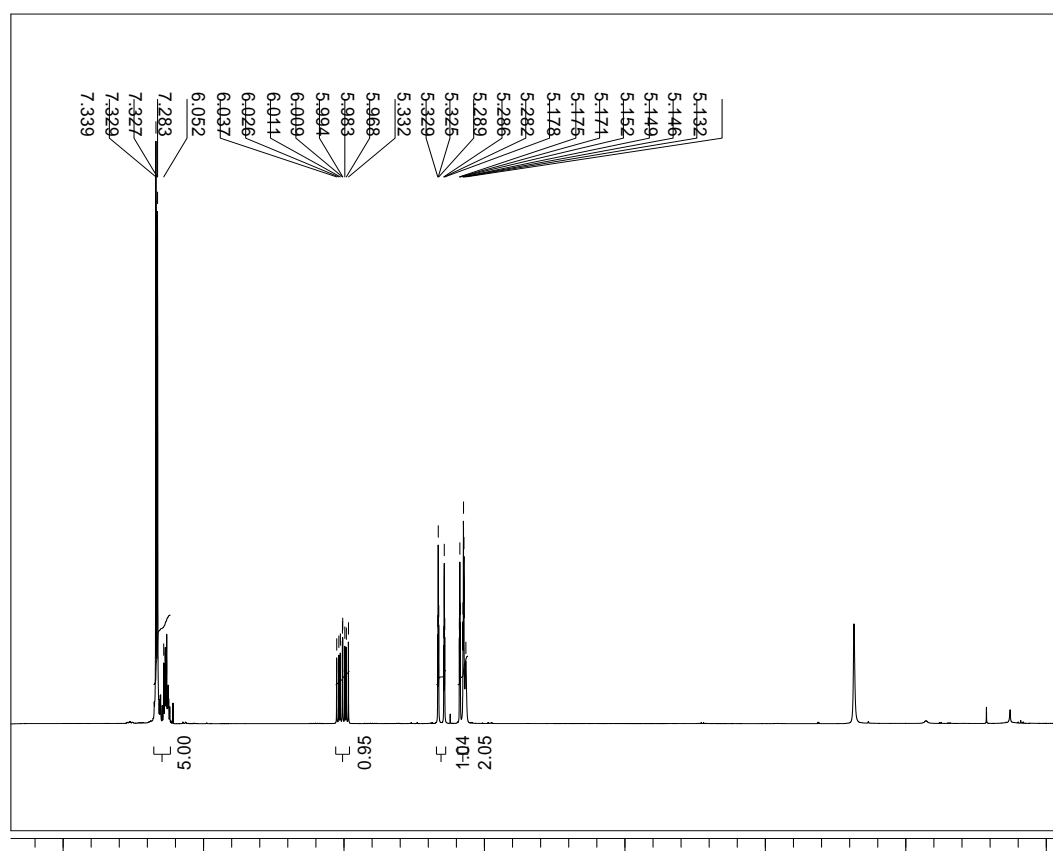
- fats by a commercial immobilized lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, **11**, 677-686, 2001.
- PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29**, 119-131, part 2, 1999.
- PATEL, M.T.; NAGARAJAN, R.; KILARA, A. Hydrolysis of milk fat by lipase in solvent-free phospholipid reverse micellar media. *J. Food. Sci.*, **61**, 33-38, 1996.
- PERRIN, D.D. and ARMAREGO, W.L.F. **Purification of laboratory chemicals**. Pergamon Press, New York, 1998.
- PHYTIAN, S.H. **Esterases**. In: **Biotechnology-Series**. Wiley-VCH, Weinheim, 193-241, 1998.
- PIETERSON, W. A.; VIDAL, J. C.; VOLWERK, J. J.; HAAS, G. H. Zymogen-catalyzed hydrolysis of monomeric substrates and the presence of a recognition site for lipid-water interfaces in phospholipase A2. *Biochemistry*, **13**, 1455, 1974.
- PIMENTEL, M.C.B.; KRIEGER, N.; COELHO, L.C.C.B.; FONTANA, J.O.; MELO, E.H.M.; LEDINGHEM, W.M.; LIMA-FILHO, J.L. Lipase from a brazilian strain of a *Penicillium citrinum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **49(1)**, 59-74, 1994.
- PRELOG, V. This rule has also been extended to reductions catalyzed by baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Pure Appl. Chem.* **9**, 109 -130, 1964.
- RAMINELLI, C.; COMASSETO, J.V.; ANDRADE, L.H.; PORTO, A.L.M. Kinetic resolution of propargylic and allylic alcohols by *Candida antarctica* lipase (Novozyme 435). *Tetrahedron Asymmetry*, **15**, 3117-3122, 2004.
- ROBERTS, S.M. Preparative biotransformations. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 1-29, 1999.
- ROBERTS, S.M. Preparative biotransformations. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 611-625, 2000.

- ROBERTS, S.M. Preparative biotransformations: the employment of enzymes and whole-cells in synthetic organic chemistry. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 157-168, 1998.
- ROTTICCI, D.; ORRENIUS, C.; HULT, K.; NORIN, T. Enantiomerically enriched bifunctional sec-alcohols prepared by *Candida antarctica* lipase B catalysis. Evidence of non-steric interactions. *Tetrahedron Asymm.*, **8**, 359-362, 1996.
- RUSSEL, J.T.; DIDIER, C.; ALANIN, N. Esterification and interesterification activities of lipases from *Rhizopus niveus* and *Mucor miechei* in three different types of organic media: a comparative study. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **22**, 439-445, 1998.
- SAKURAI, T.; MARGOLIN, A. L.; RUSSEL, A. J.; KLIBANOV, A. M. Control of enzyme enantioselectivity by the reaction medium. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7236-7237, 1988.
- SANTANIELLO, E.; FERRABOSACHI, P.; GRISENTI, P.; MANZOCCHI, A. The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks. *Chem. Rev.*, **92**, 1071-1140, 1992.
- SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 513-521, 1958.
- SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 1609-1633, 1998.
- SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. A refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*. *J. Mol. Biol.*, **230**, 575-591, 1993.
- SCHRAG, J. D.; LI, Y.; WU, S.; CYGLER, M. Ser-His-Glu triad form the catalytic site of the lipase from the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, **351**, 761-764, 1991.
- SECUNDO, F.; RIVA, S.; CARREA, G. Effect of medium and reaction conditions on the enantioselectivity of lipases in organic solvents and possible rationales. *Tetrahedron Asymmetry*, **3**, 267-280, 1992.
- SELMi, B.; GONTIER, E.; THOMAS, D. Effects of fatty acid chain length and unsaturation number on triglyceride synthesis catalyzed by immobilized lipase in solvent-free medium. *Enzyme microb. Technol.*, **23**, 182-186, 1998.

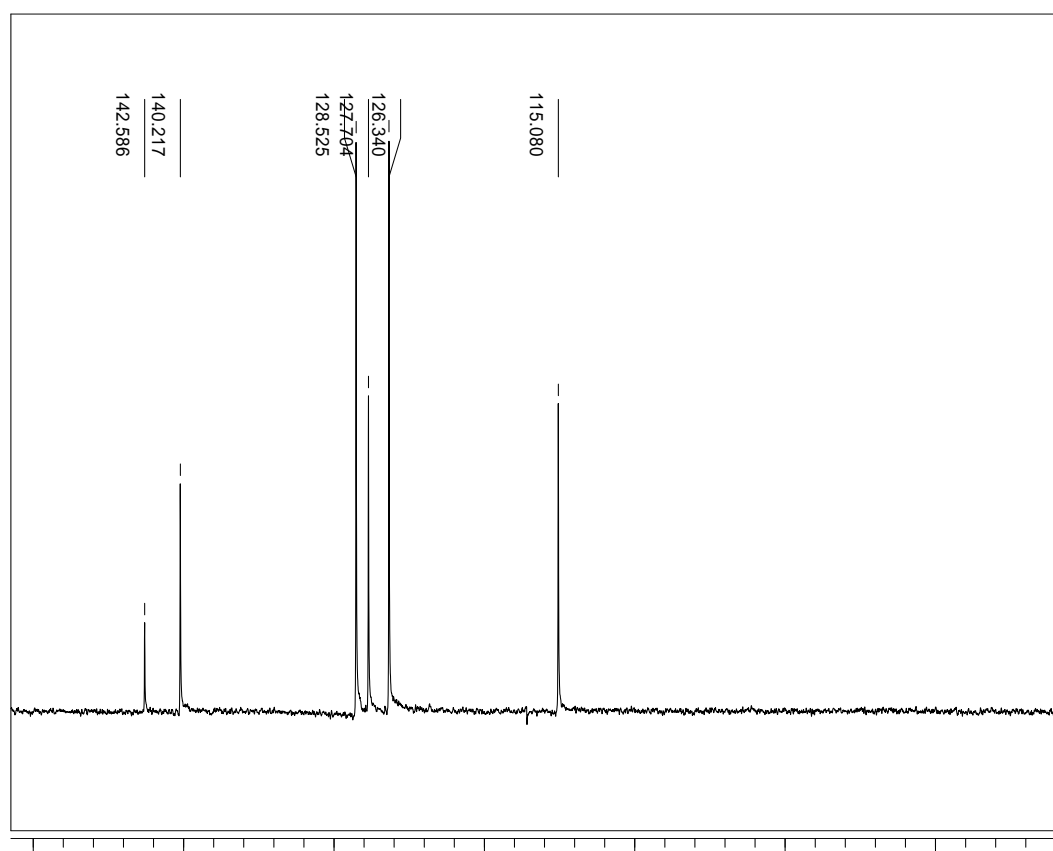
- SHARMA, R.; CHIST, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases: Research review paper. *Biotechnol. Adv.*, **35**, 627-662, 2001.
- SIH, C.J.; CHEN, C.S. Aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: the use of lipases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 695-707, 1989.
- SIH, C.J.; GIRDAUKAS, G.; FUJIMOTO, Y.; CHEN, C.S. Quantitative analyses of biochemical Kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7294, 1982.
- SIH, C.J.; WU, S.H. Resolution of enantiomers via biocatalysis. *Topics Stereochem.*, **19**, 63-125, 1989.
- STECHER, H.; FABER, K. Biocatalytic Deracemization Techniques: Dynamic Resolutions and Stereoinversions. *Synthesis*, 1-16, 1997.
- STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U.K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **168**, 1070-1074, 1986.
- TAWAKI, S.; KLIBANOV, A. M. Inversion of enzyme enantioselectivity mediated by the solvent. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1882-1884, 1992.
- THEIL, F. Lipase-Supported Synthesis of Biologically Active Compounds. *Chem. Rev.*, **95**, 2203-2227, 1995.
- UL-HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA, M.I. Production of lipase by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Process Biochem.*, **37**, 637-641, 2002.
- UNDURRAGA, D.; MARKOVITS, A.; ERAZO, S. Cocoa butter equivalent through enzymatic esterification of palm oil midfraction. *Process Biochem.*; **36**, 933-939.
- UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T.A. The sequence, crystal *Candida antarctica*. *Structure*, **2**, 293-308, 1994.
- VAN DYCK, S.M.O.; LEMIERE, G.L.F.; JONCKERS, T.H.M.; DOMMISSE, R.; PIETERS, L.; BUSS, V. Kinetic resolution of a dihydrobenzofuran-type neoligan by lipase-catalysed acetylation. *Tetrahedron: Asymmetry*, **12**, 785-789, 2001.
- VERGER, R.; MIERAS, M.C.; HAAS, G.H. Action of phospholipase A₂ at interfaces. *J. Biol. Chem.*, **248**, 4023-4034, 1973.

- VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trens Biotechnol.*, **15**, 32-38, 1997.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*; **9**, 113-148, 2000.
- WALDINGER, CLAUDIA; SCHNEIDER, MANFRED; BOTTA, MAURIZIO; CORELLI, FEDERICO; SUMMA, VINCENZO. Aryl propargylic alcohols of high enantiomeric purity via lipase catalyzed resolutions. *Tetrahedron Asymmetry*, **5**, 1485-1490, 1996.
- WESCOTT, C. R.; NORITOMI, H.; KLIBANOV, A. M. Rational Control of Enzymatic Enantioselectivity through Solvation Thermodynamics. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10365-10370, 1996.
- WINKLER, F. K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, **343**, 771-774, 1990.
- YAMAMOTO, K.; NISHIOKA, J.; ODA, Y.; YAMAMOTO, Y. Asymmetric ring opening of cyclic acid anhydrides with lipase in organic solvents. *Tetrahedron Lett.*, **29**, 1717-1720, 1988.
- XIN, J.Y.; LI, S.B.; XU, Y.; WANG, L.L. Enzymatic resolution of (S) (+) Naproxen in a trapped aqueous organic solvent biphasic continuous reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **68**, 78-83, 2000.
- XU, DAIWANG; LI, ZUYI; MA, SHENGMING. Novozym-435-catalyzed enzymatic separation of racemic propargylic alcohols. A facile route to optically active terminal aryl propargylic alcohols. *Tetrahedron Lett.*, **44**, 6343-6347, 2003.
- XU, DAIWANG; LI, ZUYI; MA, SHENGMING. Novozym-435-catalyzed efficient preparation of (1S)-ethenyl and ethynyl 2,3-allenols and (1R)-ethenyl and ethynyl 2,3-allenyl acetates with high enantiomeric excess. *Tetrahedron Asymmetry*, **14**, 3657-3667, 2003.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.*, **263**, 3194-3201, 1988.

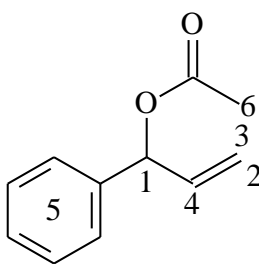
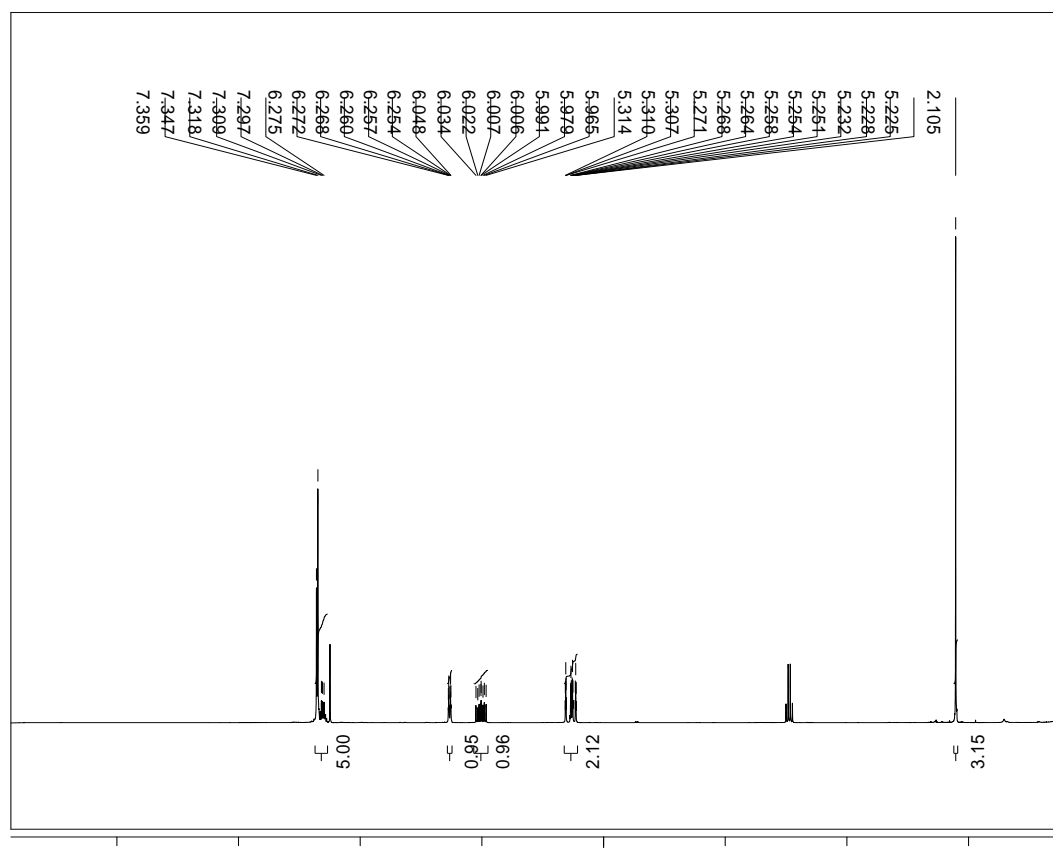
ESPECTROS SELECCIONADOS

VIII.1- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (*S*)-(-)-1-fenilprop-2-en-1-ol (10).

hidrogênio	deslocamento (ppm)	multiplicidade	J(Hz)
1	5,14	d	6,1
2	5,16	ddd	10,3: 1,4: 1,4
3	5,31	ddd	17,1: 1,4: 1,4
4	6,00	ddd	17,1: 10,3: 6,1
5	7,27 - 7,34	m	

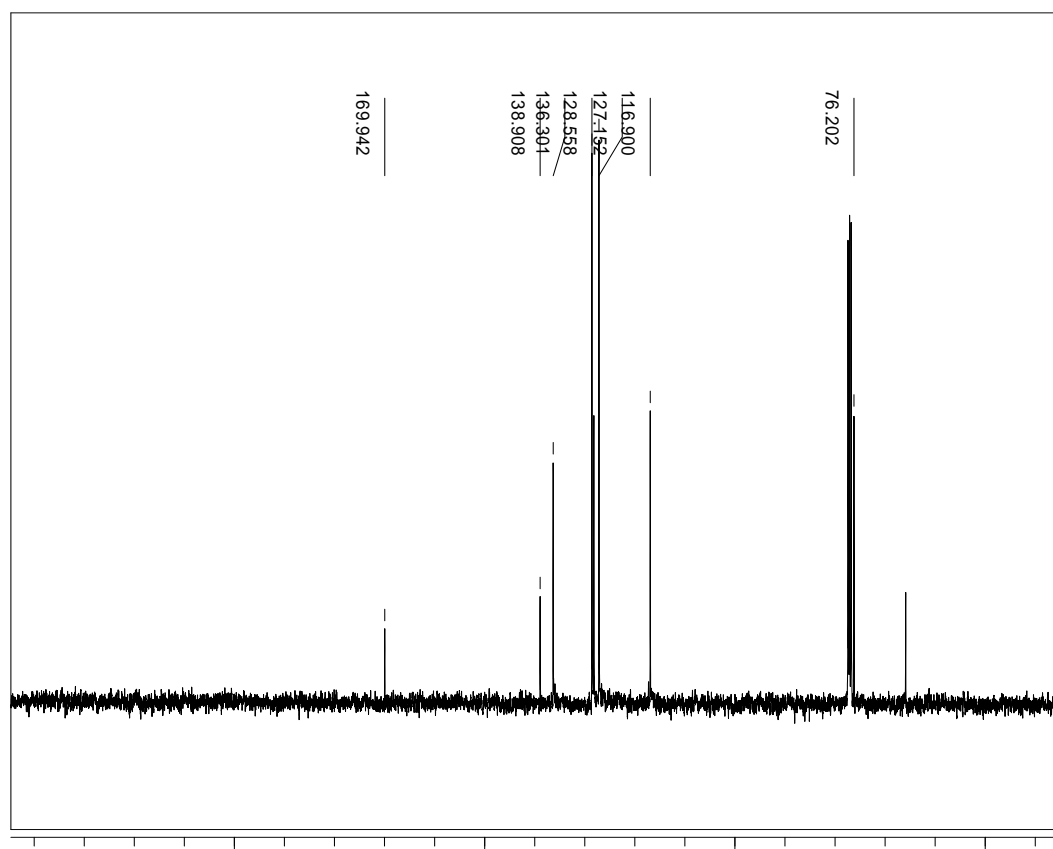
VIII.2 - Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do (*S*)-(-)-1-fenilprop-2-en-1-ol (10).

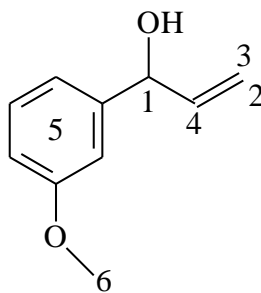
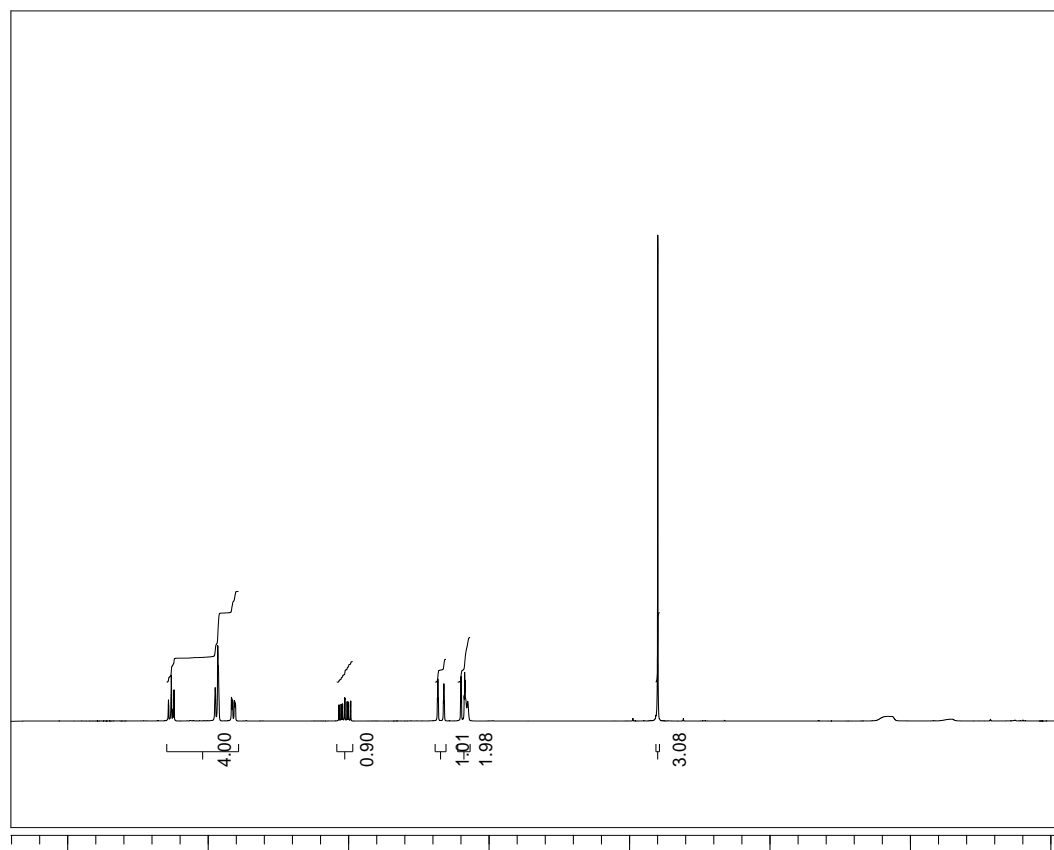
VIII.3 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do acetato de (*R*)-(+)-1-fenilprop-2-enila (17).



hidrogênio	deslocamento (ppm)	multiplicidade	J(Hz)
1	6,26	ddd	5,9: 1,3: 1,3
2	5,24	ddd	10,5: 1,3: 1,3
3	5,25	ddd	17,2: 1,3: 1,3
4	6,00	ddd	17,2: 10,5: 5,9
5	7,31 - 7,35	m	
6	2,11	s	

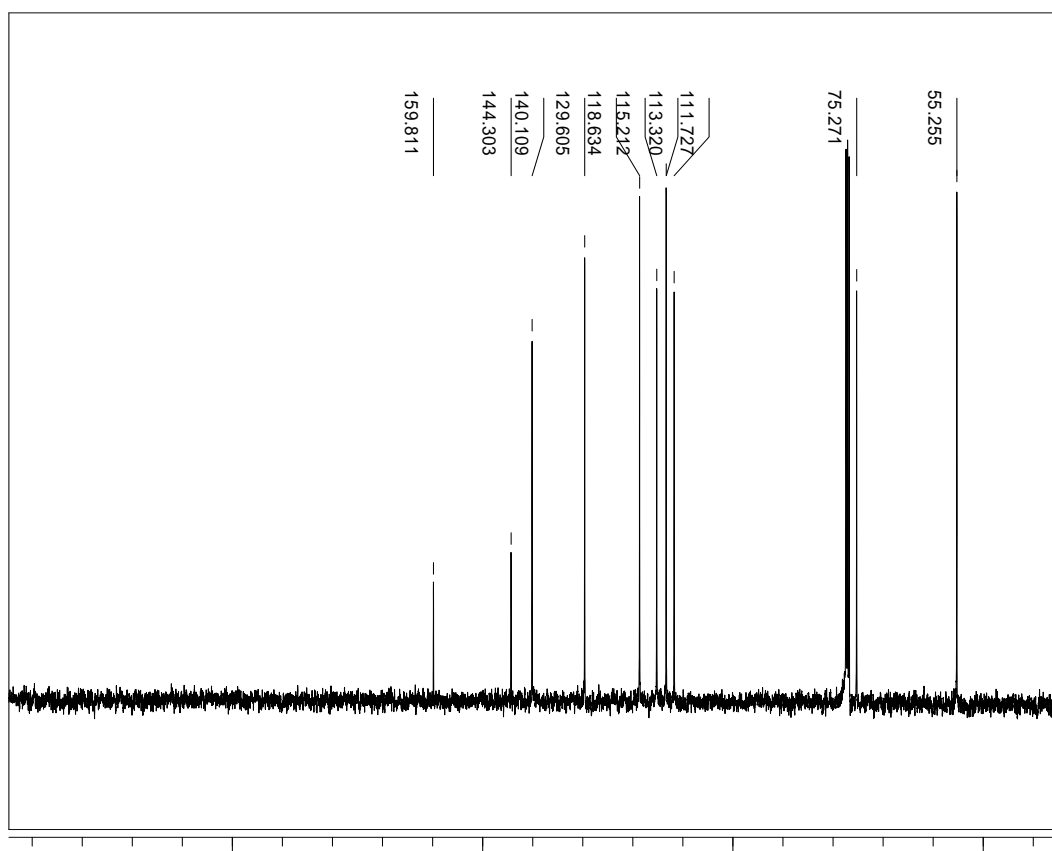
VIII.4 - Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do acetato de (*R*)-(+)-1-fenilprop-2-enila (17).



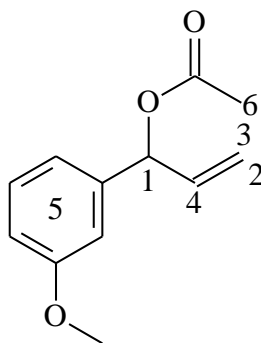
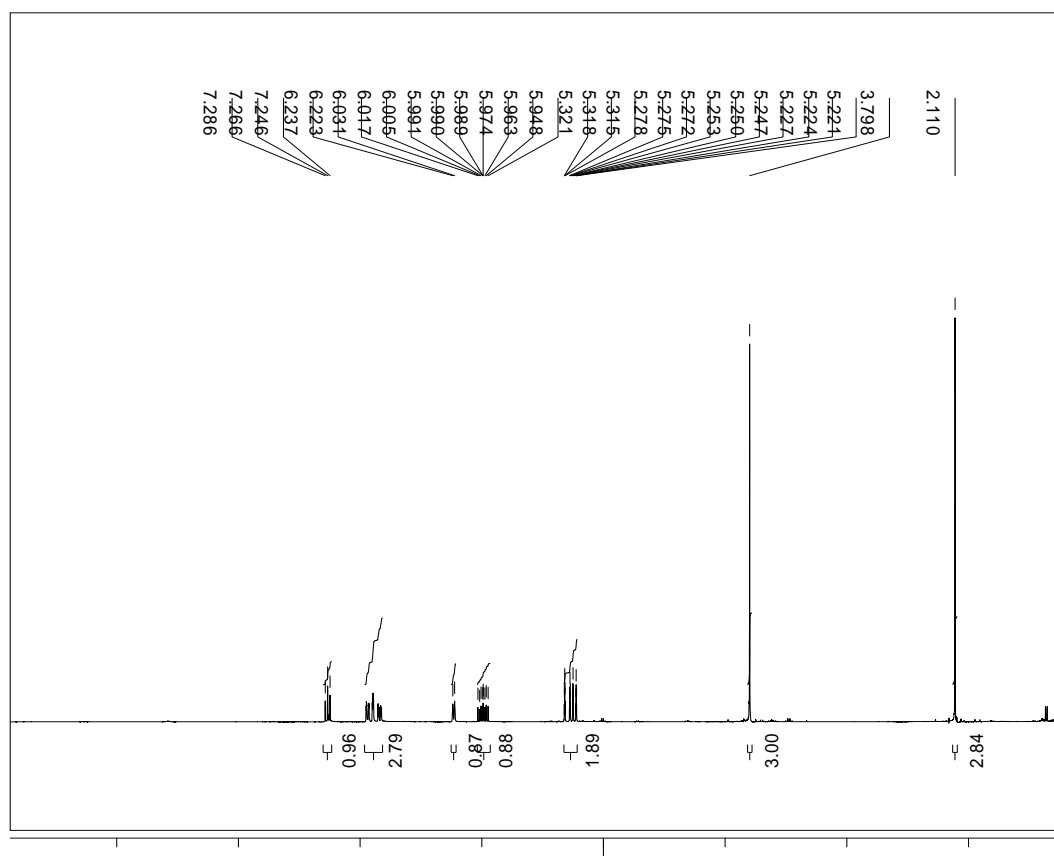
VIII.5 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (*S*)-(-)- (*m*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol(8).

hidrogênio	deslocamento (ppm)	multiplicidade	J(Hz)
1	5,16	d	6,0
2	5,19	ddd	10,3: 1,4: 1,3
3	5,34	ddd	17,1: 1,4: 1,4
4	6,03	ddd	17,1: 10,3: 6,0
5	6,82 - 7,26	m	
6	3,80	s	

VIII.6 - Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do (*S*)-(-)- (*m*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol(8).

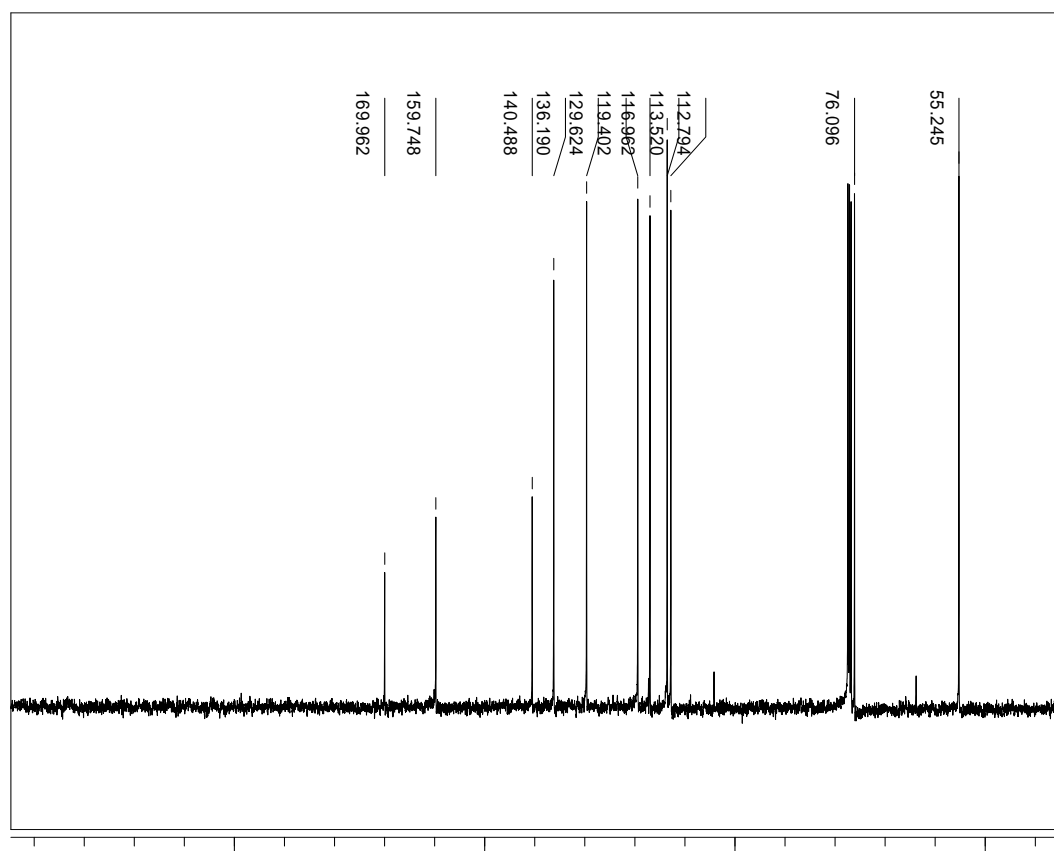


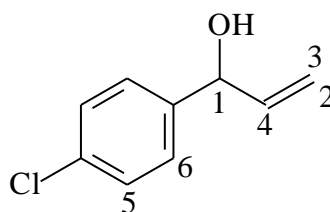
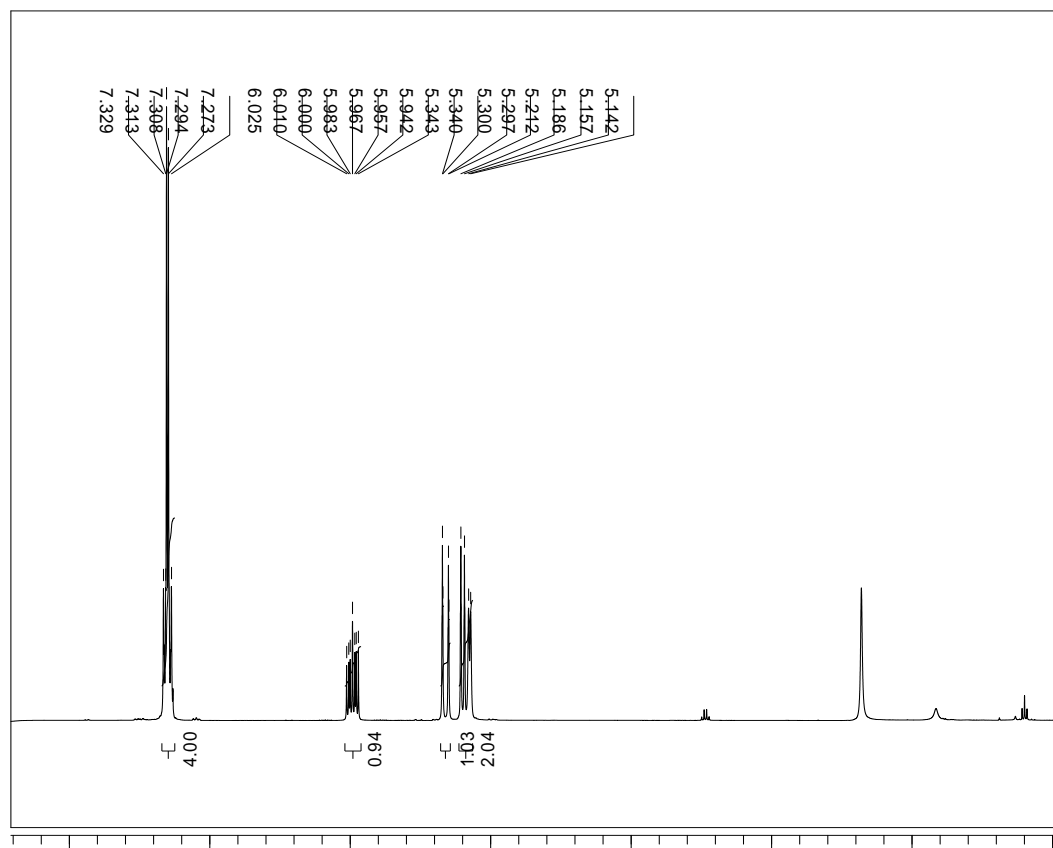
VIII.7 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do acetato de (*R*)-(+)- (*m*-metoxifenil)prop-2-enila (15).



hidrogênio	deslocamento (ppm)	multiplicidade	J(Hz)
1	6,23	ddd	6,0: 1,3: 1,2
2	5,24	ddd	10,5: 1,3: 1,2
3	5,29	ddd	17,2: 1,3: 1,2
4	5,98	ddd	17,1: 10,5: 6,0
5	6,84 - 7,27	m	
6	2,11	s	
7	3,80	s	

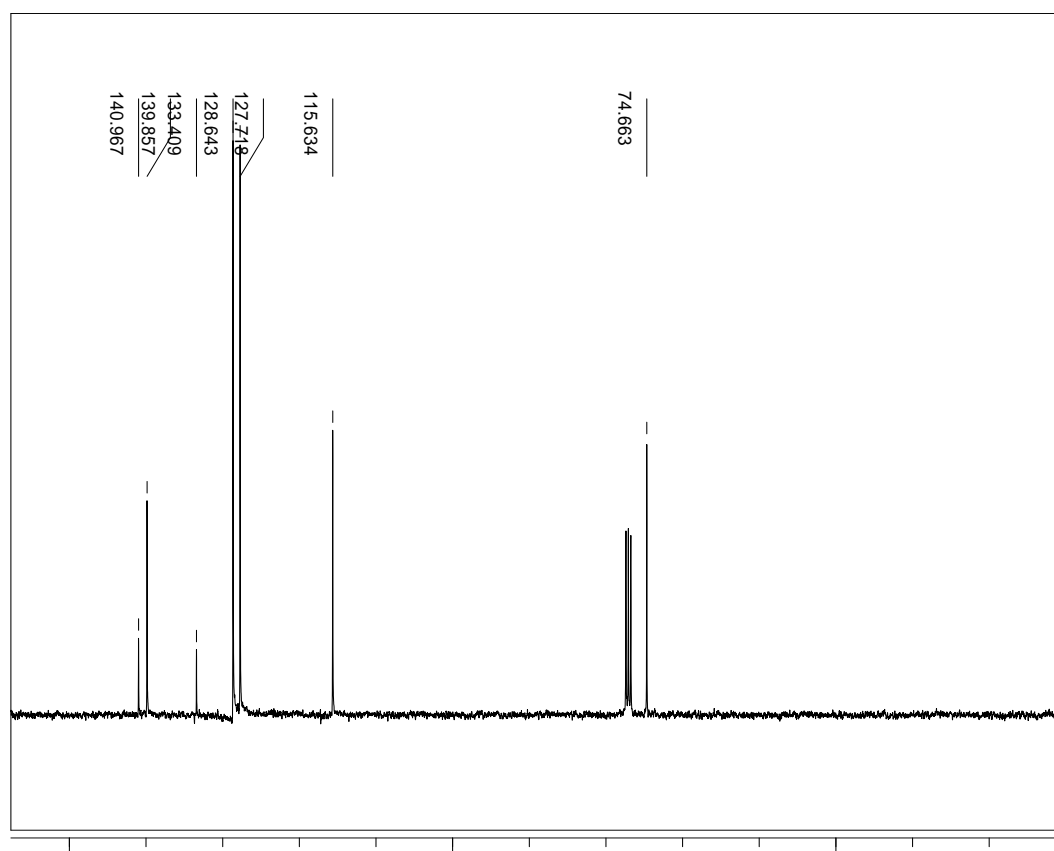
VIII.8 - Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do acetato de (*R*)-(+)- (*m*-metoxifenil)prop-2-enila (15).



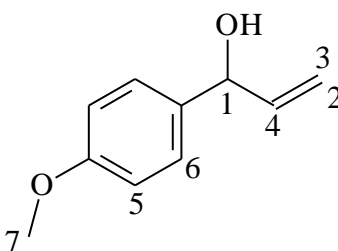
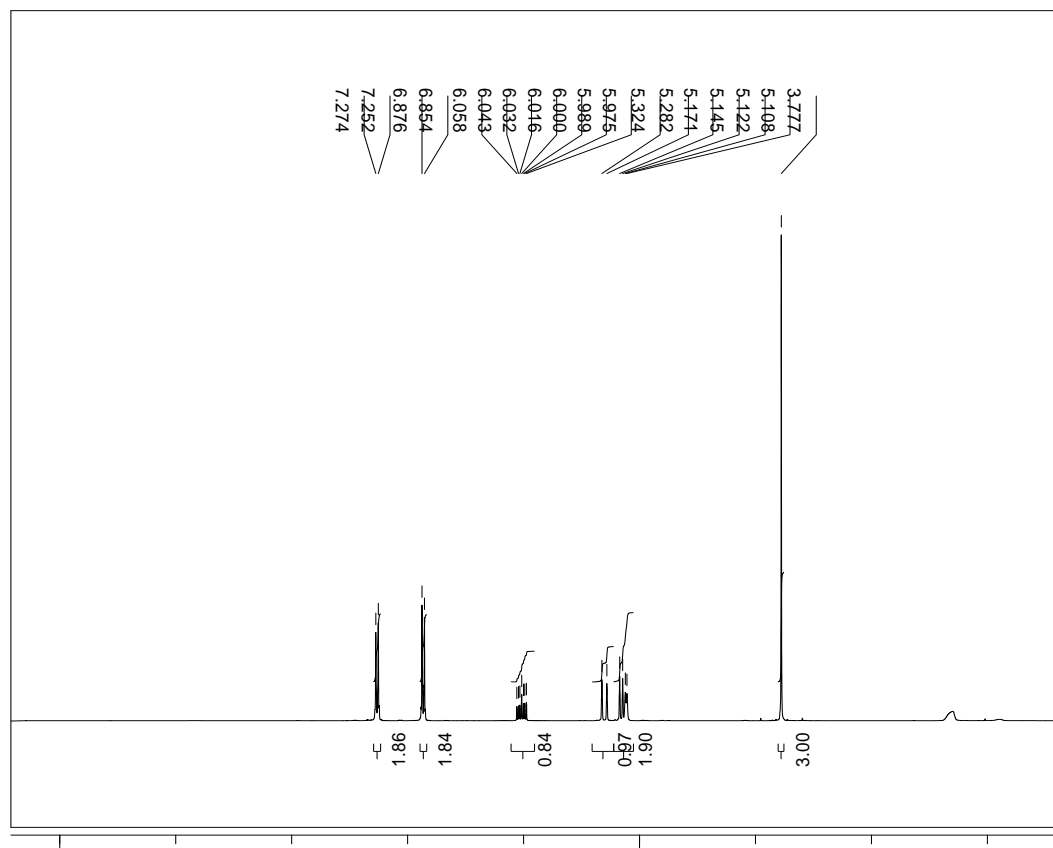
VIII. 9 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (*S*)-(-)- *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (11).

hidrogênio	deslocamento (ppm)	multiplicidade	J(Hz)
1	5,15	d	6,1
2	5,20	dd	10,4: 1,3:
3	5,32	ddd	17,0: 1,3:
4	5,98	ddd	17,0: 10,4: 6,1
5	7,28	d	8,6
6	7,32	d	8,6

VIII.10 - Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do (S)-(-)- *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol(11).

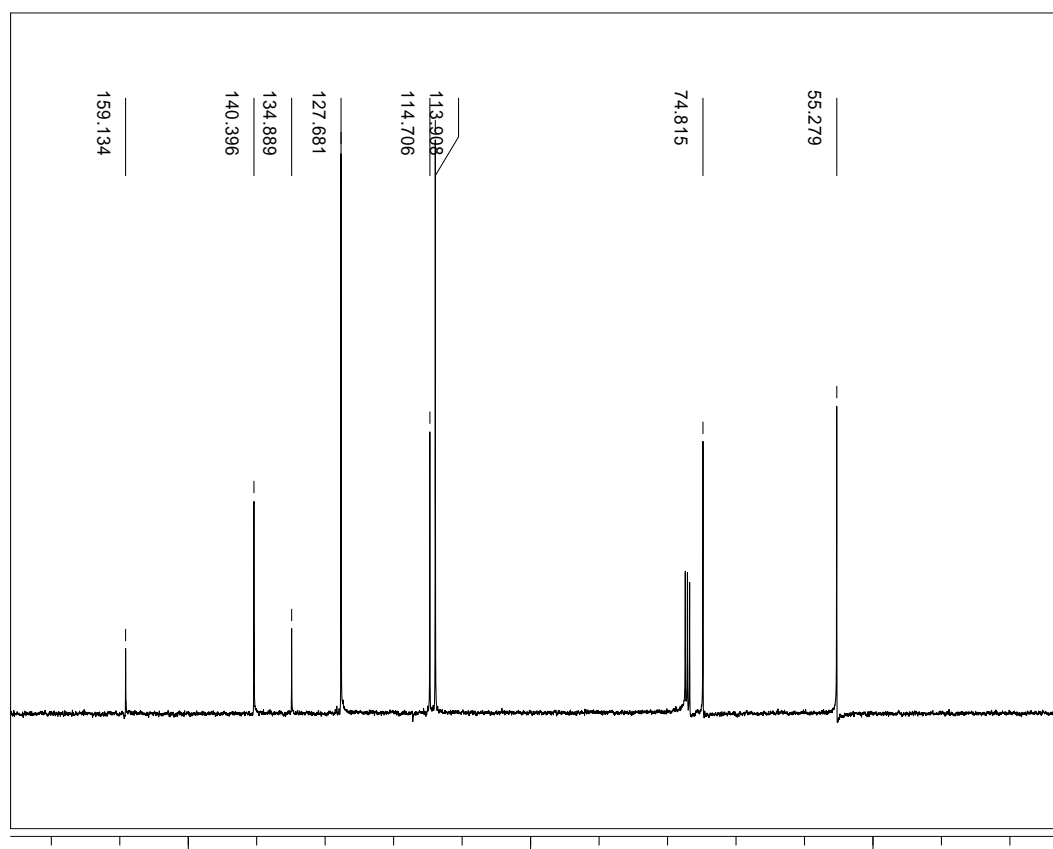


VIII.11 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (*S*)-(-)- (*p*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol(9).

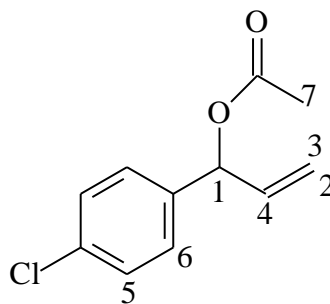
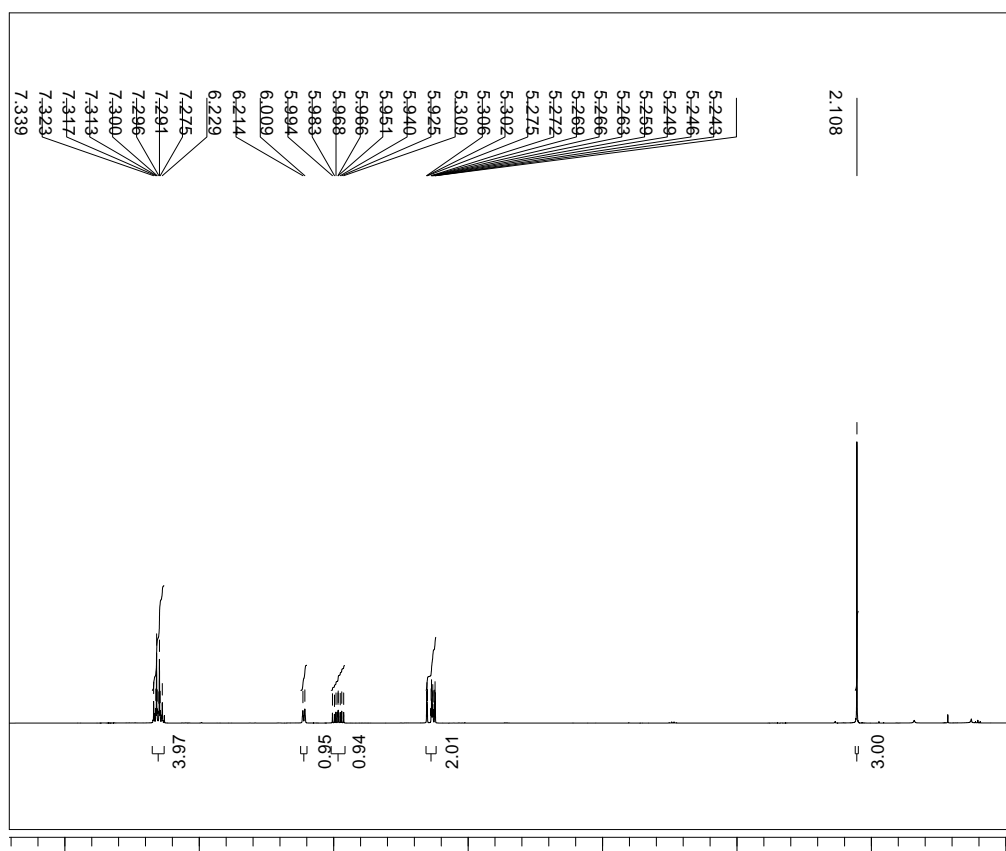


hidrogênio	deslocamento (ppm)	multiplicidade	J(Hz)
1	5,11	d	5,6
2	5,16	d	10,3:
3	5,30	ddd	17,0:
4	6,02	ddd	17,0: 10,3: 5,6
5	7,28	d	8,6
6	7,32	d	8,6
7	3,78	s	

VIII.12 - Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do (*S*)-(-)- (*p*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol(9).

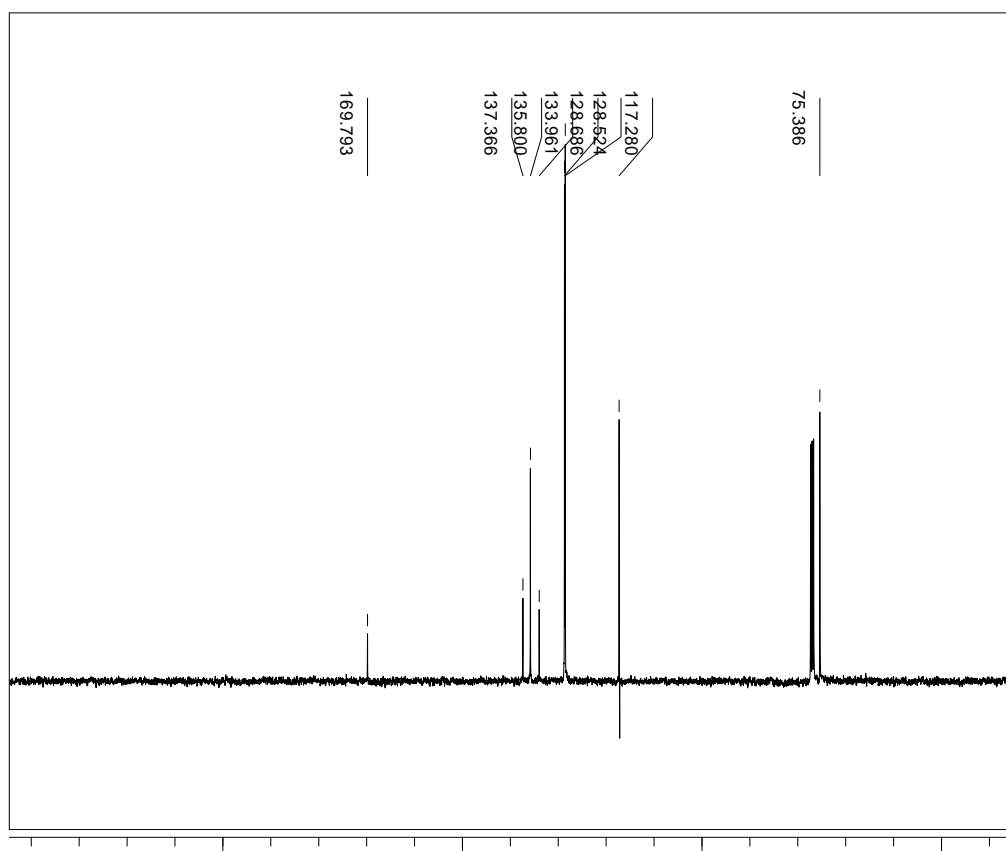


VIII.13 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do acetato de(*R*)-(+)-1-(*p*-clorofenil)prop-2-enila (18).

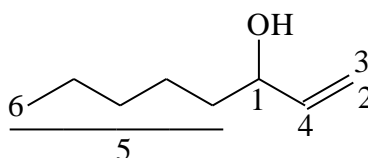
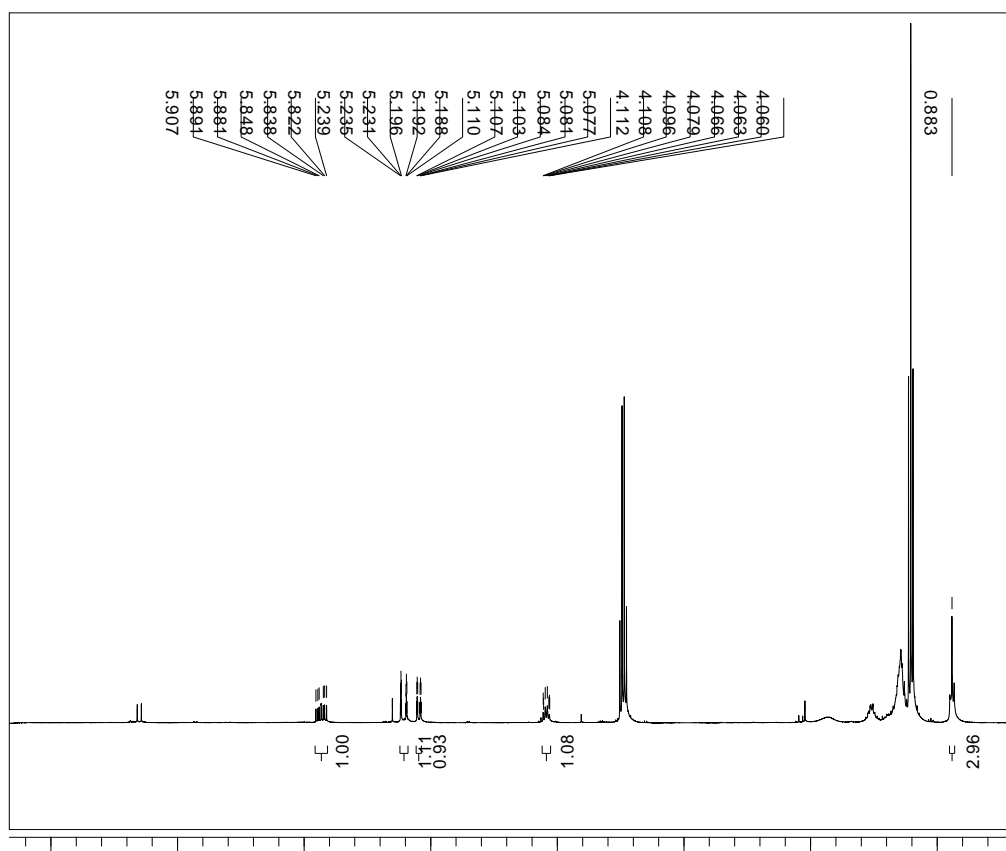


hidrogênio	deslocamento (ppm)	multiplicidade	J(Hz)
1	6,22	ddd	5,9: 1,5: 1,2
2	5,28	ddd	17,1: 1,5: 1,2
3	5,48	ddd	10,5: 1,2: 1,2
4	5,97	ddd	17,1: 10,4: 5,9
5	7,33	d	8,5
6	7,28	d	8,5
7	2,11	s	

VIII.14 - Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do acetato de (*R*)-(+)-1-(*p*-clorofenil)prop-2-enila (18).



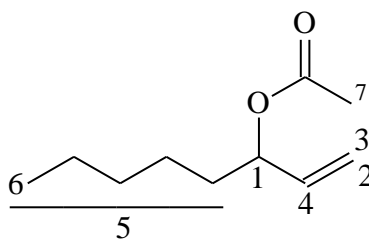
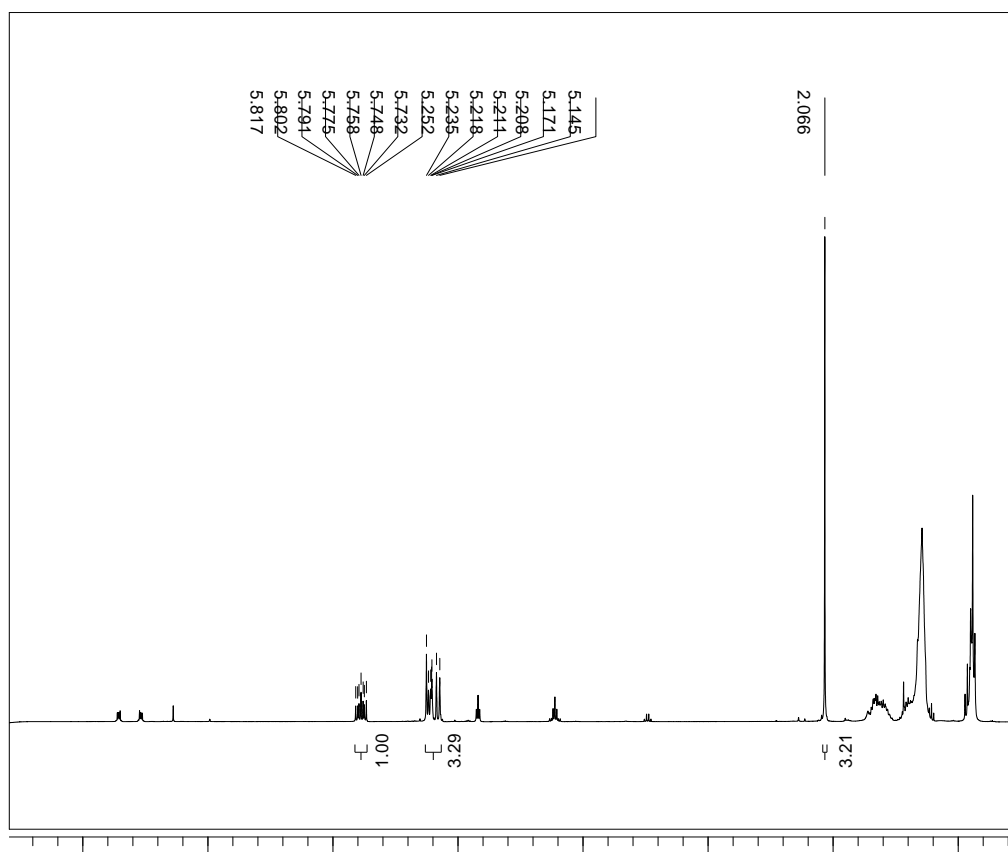
VIII.15 - Espectro de RMN 1H (400 MHz, CDCl₃) do (R)-(+)-1-octen-3-ol (6).



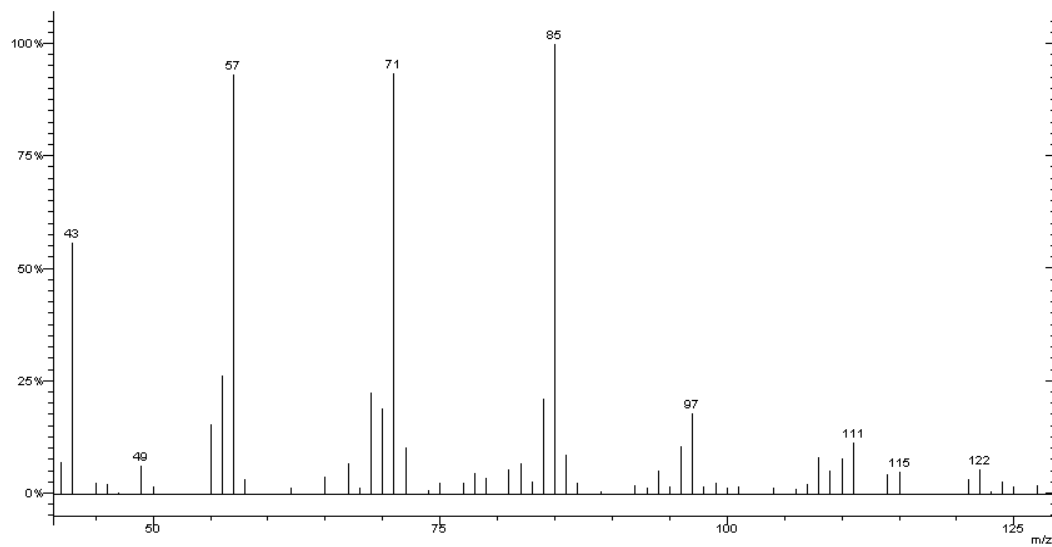
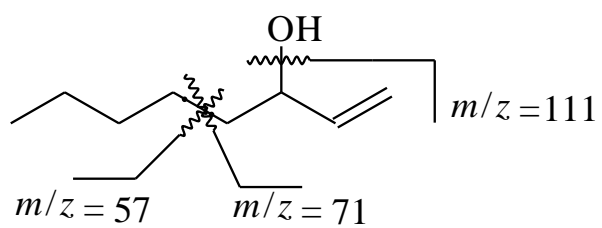
hidrogênio	deslocamento (ppm)	multiplicidade	J(Hz)
1	4,08	m	
2	5,10	ddd	10,4: 2,7: 1,3
3	5,23	ddd	17,1: 2,7: 1,3
4	5,86	ddd	17,1: 10,4: 6,2
5	1,17-1,47	m	
6	0,89	t	6,9

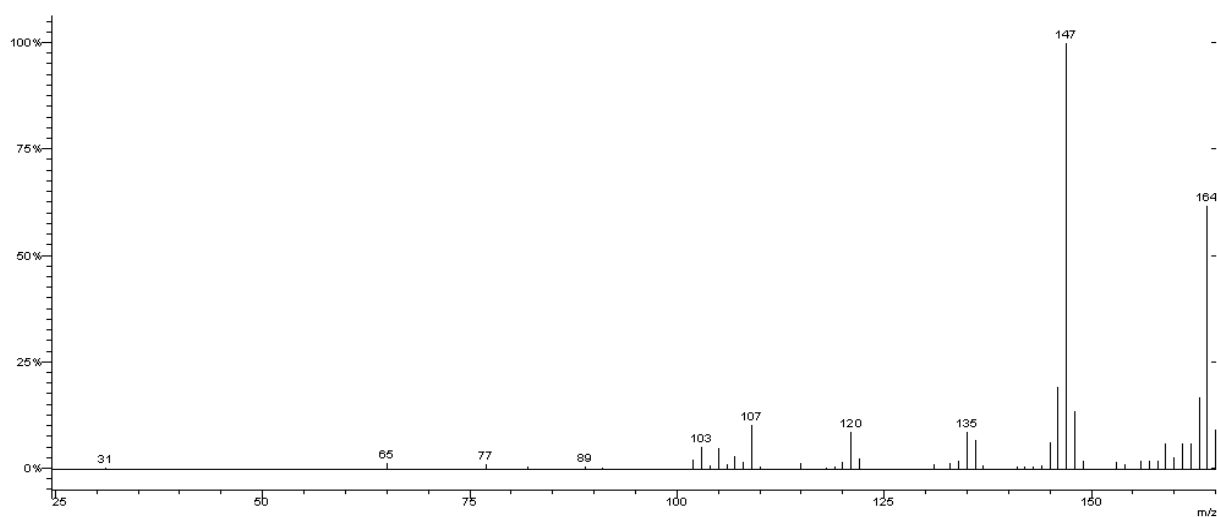
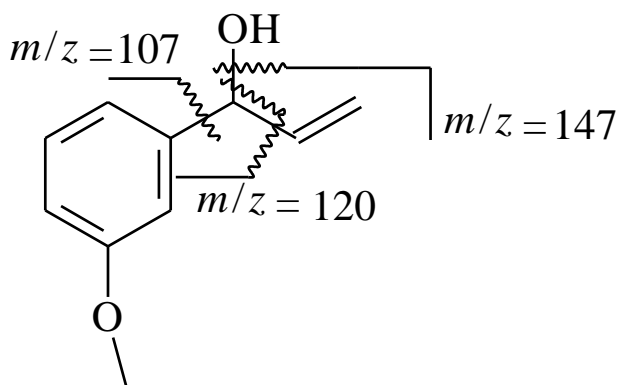
hidrogênio	deslocamento (ppm)	multiplicidade	J(Hz)
1	4,08	m	
2	5,10	ddd	10,4: 2,7: 1,3
3	5,23	ddd	17,1: 2,7: 1,3
4	5,86	ddd	17,1: 10,4: 6,2
5	1,17-1,47	m	
6	0,89	t	6,9

VIII.16 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do acetato de (*S*)-(-)-1-pentilprop-2-enila (13).

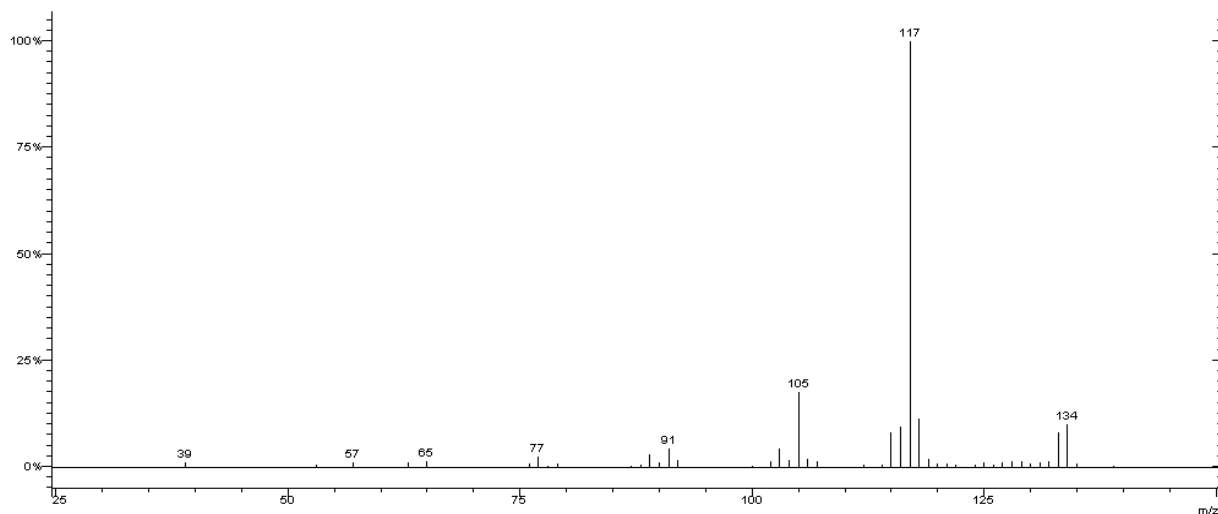
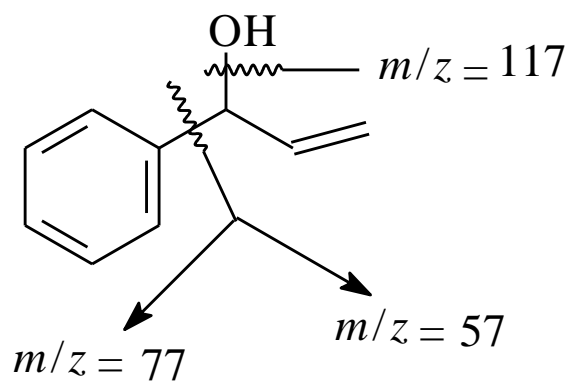


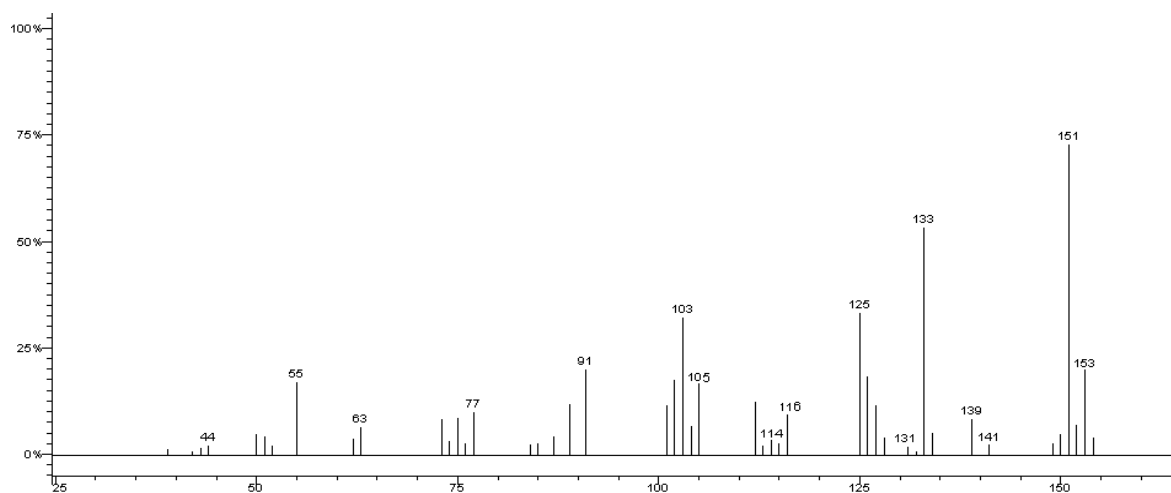
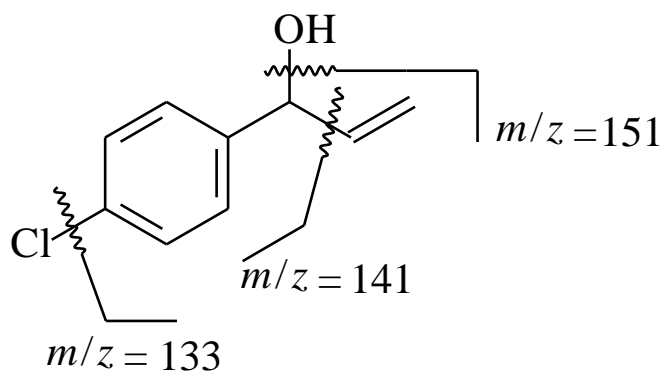
hidrogênio	deslocamento (ppm)	multiplicidade	J(Hz)
1	4,08	m	
2	5,10	ddd	10,4: 2,7: 1,3
3	5,23	ddd	17,1: 2,7: 1,3
4	5,86	ddd	17,1: 10,4: 6,2
5	1,17-1,47	m	
6	0,89	t	6,9
7	2,06	s	

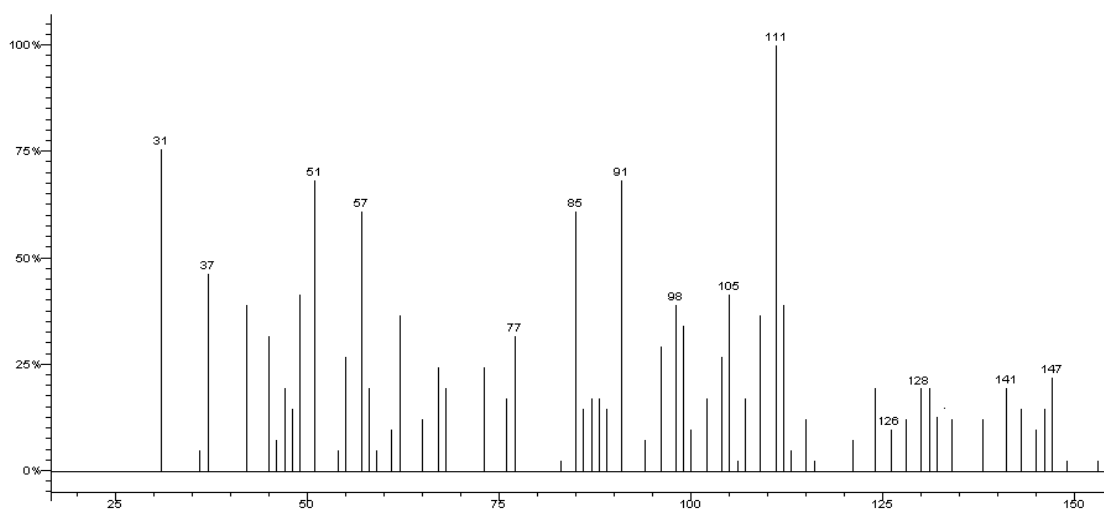
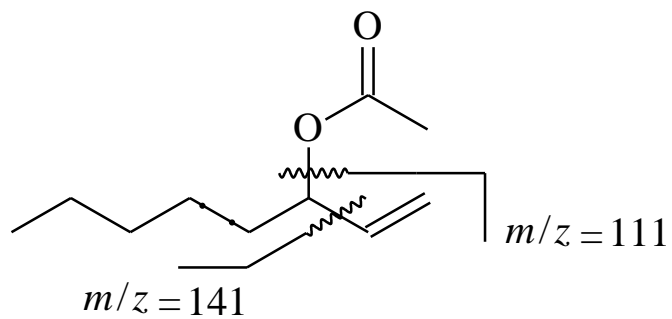
VIII.17 - Espectro de EM (IE) do (*R*)-(+)-1-octen-3-ol (6).

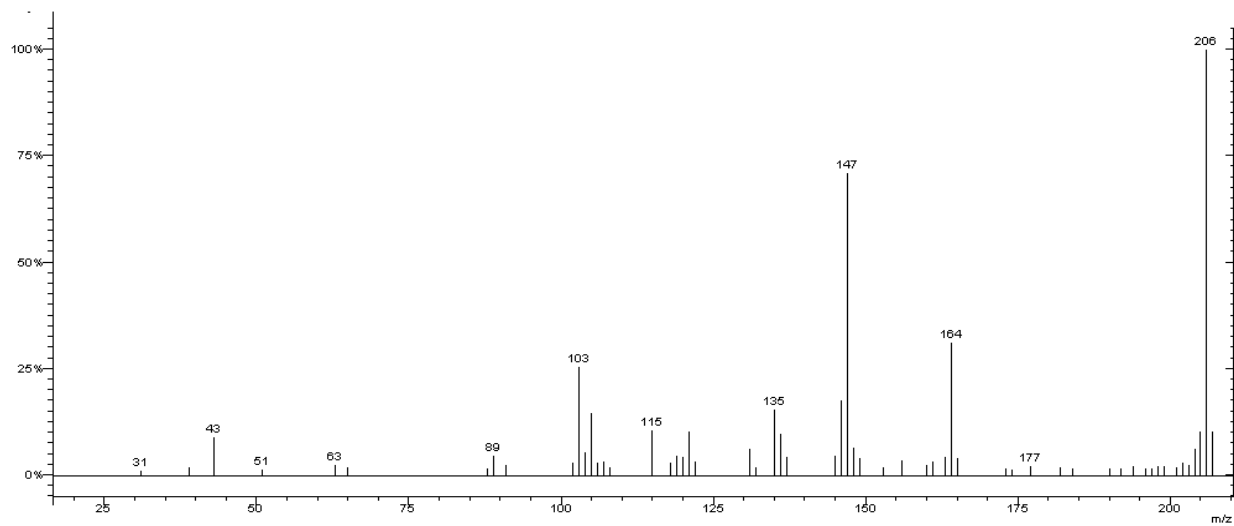
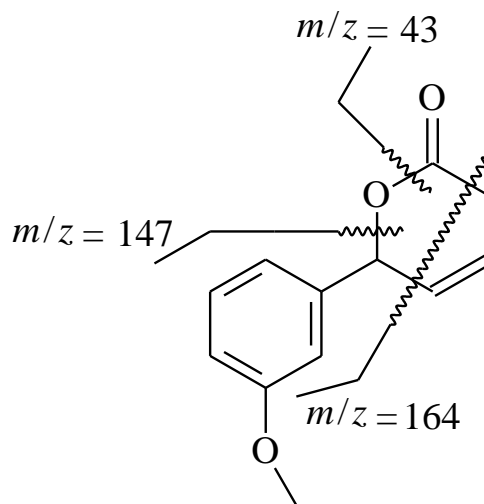
VIII.18 - Espectro de EM (IE) do (*S*)-(-)- (*m*-metoxifenil)prop-2-en-1-ol (8).

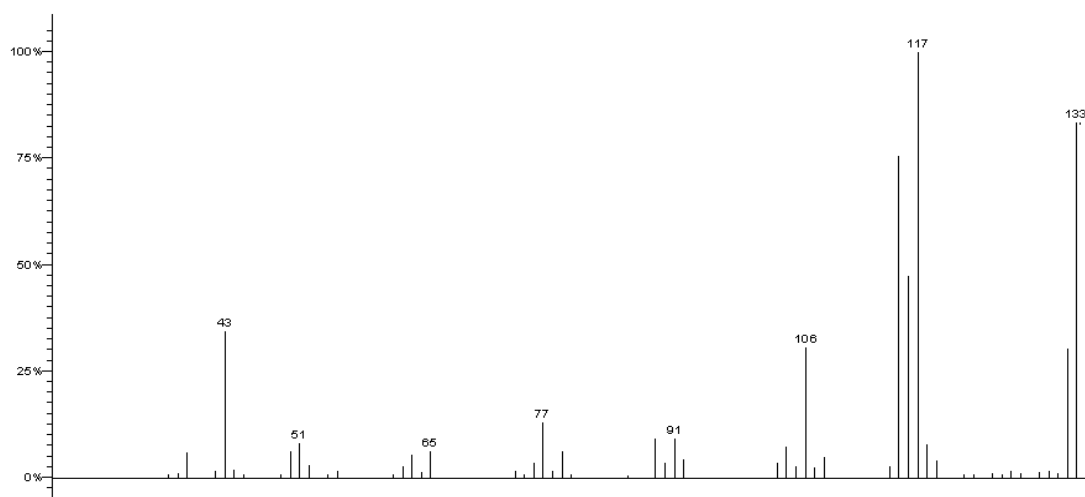
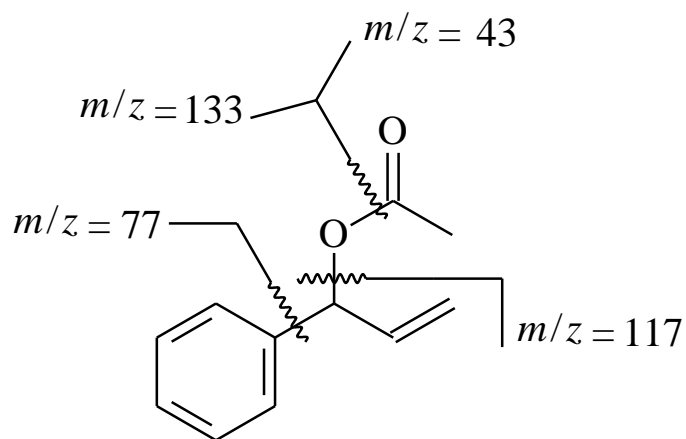
VIII.19 - Espectro de EM (IE) do (S)-(-)-1-fenilprop-2-en-1-ol (10).

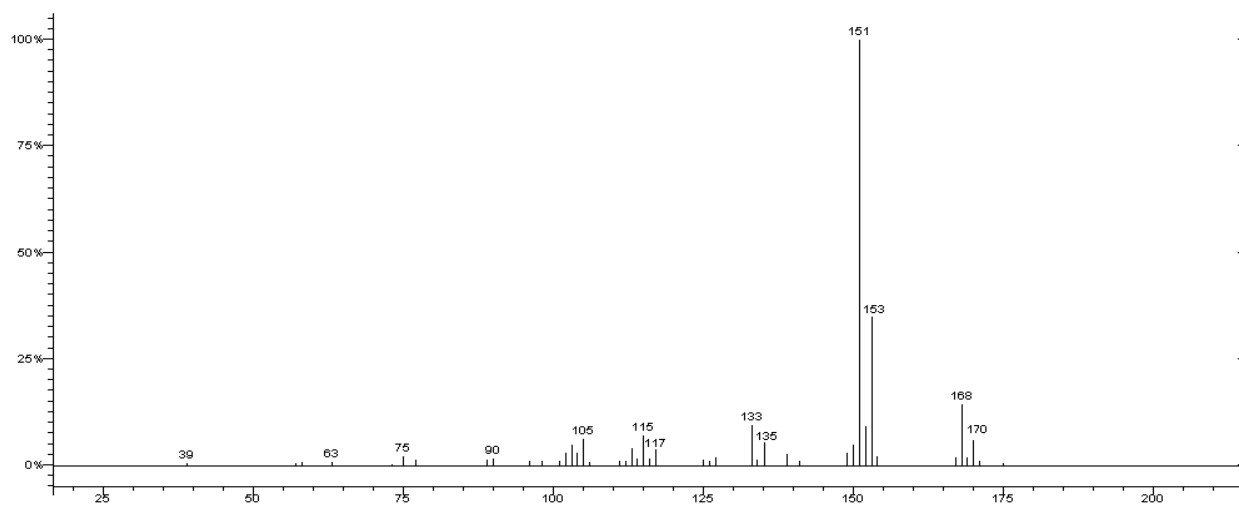
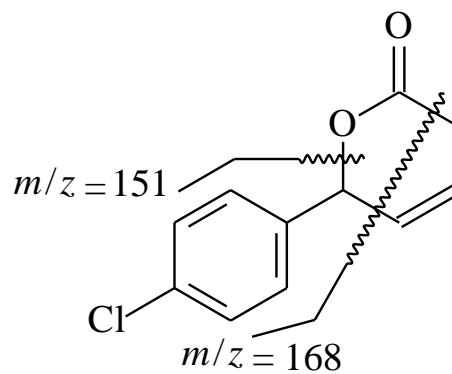


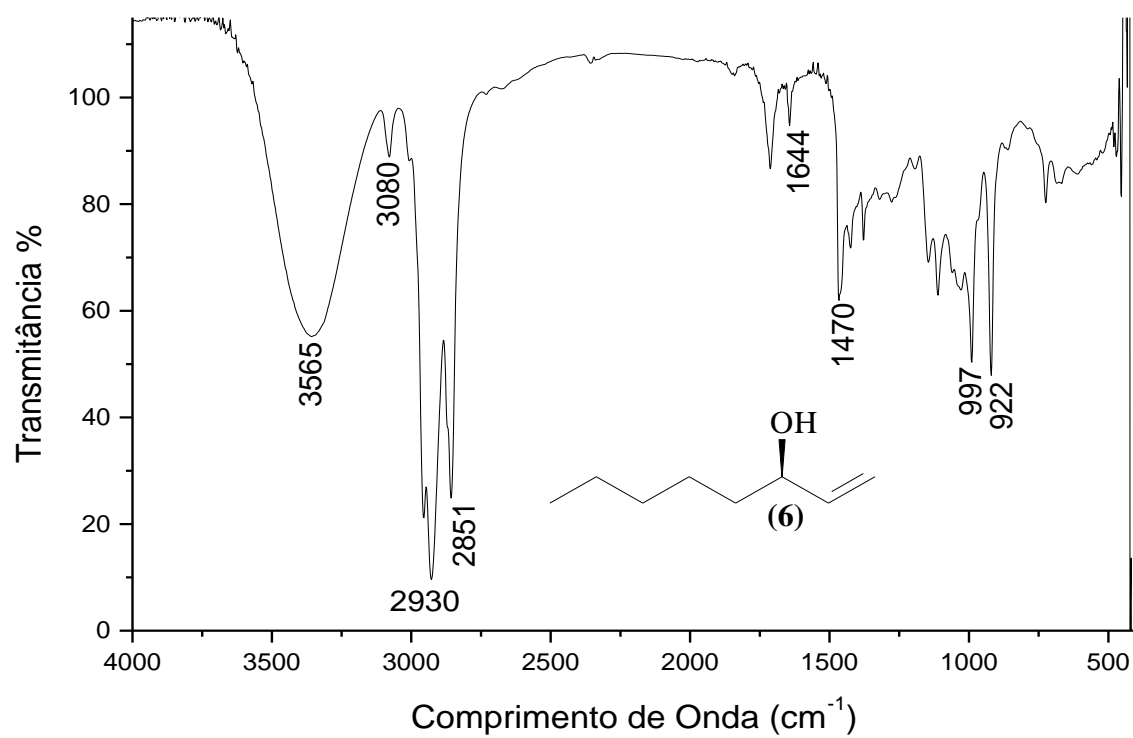
VIII. 20 - Espectro de EM (IE) do (*S*)-(-)- *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (11).

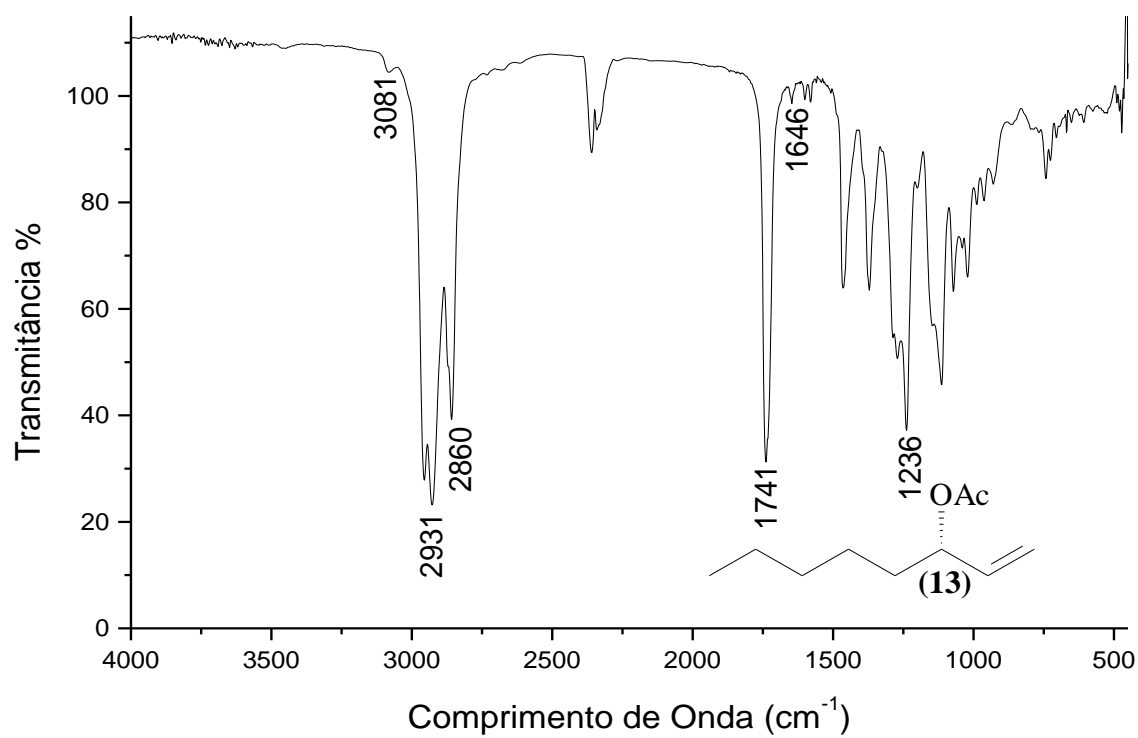
VIII. 21 - Espectro de EM (IE) do acetato de (*S*)-(-)- 1-pentilprop-2-enila (13).

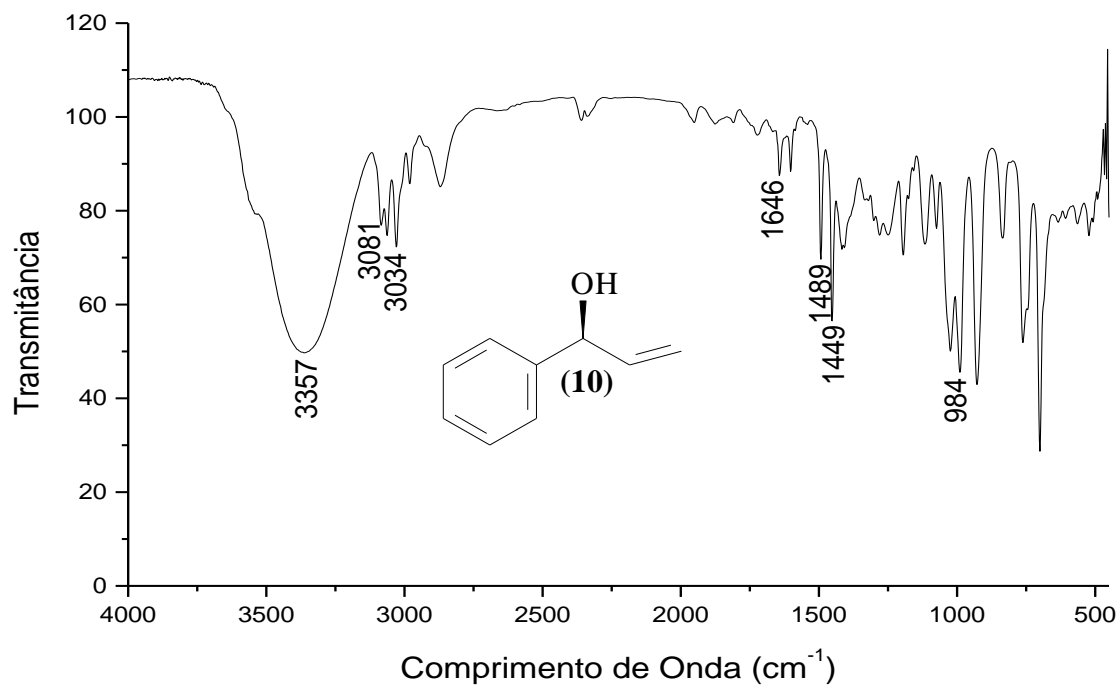
VIII. 22 - Espectro de EM (IE) do acetato de (*R*)-(+)-1-(*m*-metoxifenil) prop-2-enila (15).

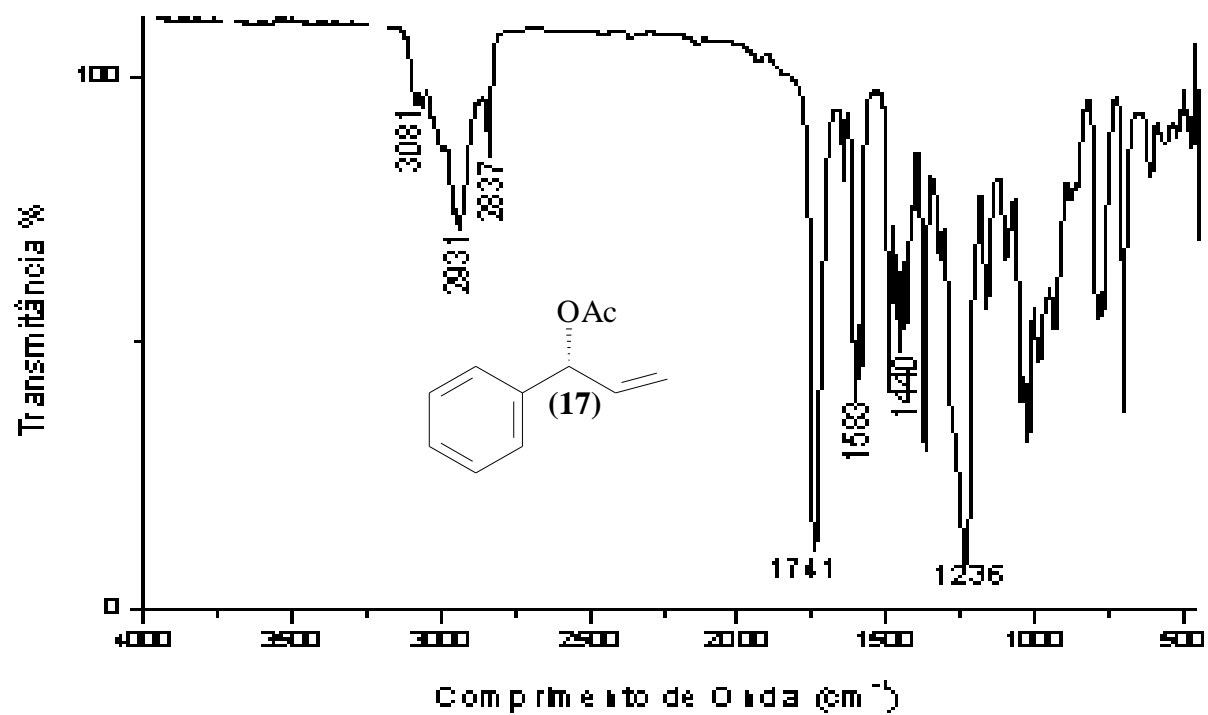
VIII. 23 - Espectro de EM (IE) do acetato de (*R*)-(+)-1-fenilprop-2-enila (17).

VIII. 24 - Espectro de EM (IE) do acetato de (*R*)-(+)-*p*-clorofenilprop-2-enila (18).

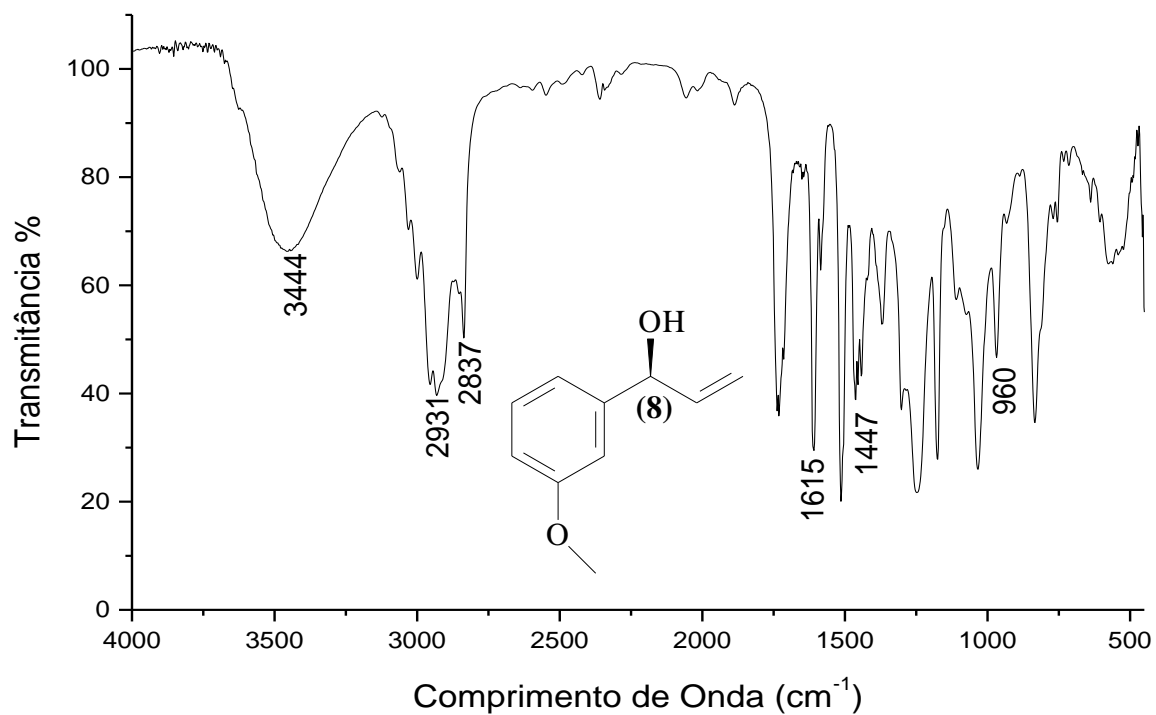
VIII. 25 - Espectro de FTIR do (*R*)-(+)-1-octen-3-ol (6).

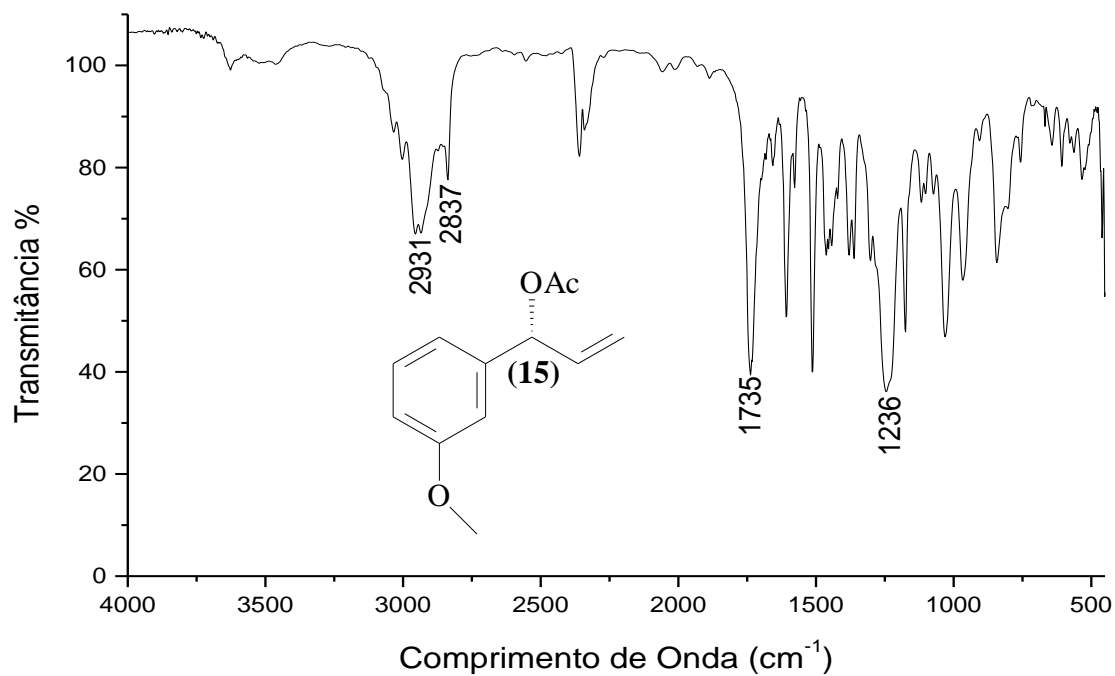
VIII. 26 - Espectro de FTIR do acetato de (*S*)-(-)-1-pentilprop-2-enila (13).

VIII. 27 - Espectro de FTIR do (*S*)-(-)-1-fenilprop-2-en-1-ol (10).

VIII. 28 - Espectro de FTIR do acetato de (*R*)-(+)-1-fenilprop-2-enila (17).

VIII. 29 - Espectro de FTIR do (S)-(-)- (m-metoxifenil)prop-2-en-1-ol (8).



VIII. 30 - Espectro de FTIR do acetato de (*R*)-(+)-1-(*m*-metoxifenil) prop-2-enila (15).

VIII. 31 - Espectro de FTIR do (*S*)-(-)- *p*-clorofenilprop-2-en-1-ol (11).